



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA
COLÓNIA DE *Glossina morsitans morsitans*,
Westwood 1850 (Díptera: Glossinidae).**

MARIA CLARA GAGO DA CÂMARA MIRANTE



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA
COLÓNIA DE *Glossina morsitans morsitans* Westwood
1850, (Díptera: Glossinidae).**

MARIA CLARA GAGO DA CÂMARA MIRANTE

*Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Parasitologia Médica.*

Orientador:

Professor Doutor António José dos Santos Grácio

2009

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças ao apoio e incentivo de amigos e familiares. No entanto gostaria de referir os que mais contribuíram para a concretização do mesmo.

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio, Presidente do Conselho Científico e Directora da Unidade de Helminologia e Macologia Médicas, o agradecimento especial pela sua disponibilidade que sempre prestou e também pelas facilidades logísticas e de equipamento que me foram cedidas para a realização de uma parte deste trabalho.

Ao meu Orientador, Professor Doutor António José dos Santos Grácio, Director da Unidade de Entomologia Médica, pelo conhecimento partilhado ao longo da realização da minha Tese em Parasitologia Médica, pela sua sempre disponibilidade na elaboração, correcção e valiosas sugestões, sem as quais estou certa que este trabalho não atingiria o nível de qualidade científica pretendido.

À Professora Doutora Maria Manuela Calado, da Unidade de Helminologia e Macologia Médicas, pelos inestimáveis ensinamentos transmitidos e colaboração que gentil e desinteressadamente prestou para que esta dissertação tomasse forma.

À Sr^a D. Sílvia Nunes, Auxiliar de Laboratório da Unidade de Entomologia Médica e responsável pela manutenção da colónia de *Glossina morsitans morsitans* agradeço profundamente todo o trabalho e paciência que me dedicou na formação da colónia que iria ser alvo de alguns estudos na realização desta Tese.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas, Gráficos e Quadros.....	xiv
Siglas e Abreviaturas.....	xvi
Resumo.....	xviii
Abstrat.....	xx
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Mosca Tsétsé, Doença do Sono e Nagana.....	2
1.1.1 - Breve história da <i>Glossina</i> e da doença do sono.....	3
1.1.2 - O Papel de Portugal no estudo da doença e das glossinas.....	5
1.1.3 - O papel da Organização Mundial da Saúde e do Mundo na actualidade-O regresso da doença do sono.....	8
1.2 - Sistemática das Glossinas.....	11
1.2.1 - Posição Sistemática do <i>Género Glossina</i> Wiedeman, 1830.....	11
1.2.2 - Cronograma da Posição Sistemática do <i>Género Glossina</i> Wiedeman, 1830.....	13
1.2.3 - <i>Género Glossina</i> Wiedeman, 1830.....	14
1.2.3.1 - Espécies e Subespécies.....	14
1.2.3.1.1 - Subgénero <i>Nemorhina</i> Robineu-Desvoidy, 1830.....	14
1.2.3.1.2 - Subgénero <i>Glossina</i> s.str. Zumpt, 1935.....	15
1.2.3.1.3 - Subgénero <i>Austenina</i> Townsend, 1921.....	16
1.2.4 - Evolução dos três Grupos do Género <i>Glossina</i>	17

1.3 - Distribuição Geográfica das Glossinas.....	19
1.3.1 - Alguns factores condicionantes.....	19
1.3.2 - Distribuição Geográfica do Grupo <i>Glossina morsitans</i>	20
1.3.2.1 - Distribuição de algumas subespécies do Grupo <i>morsitans</i>	20
1.3.3 - Habitat.....	23
1.3.4 - Comportamento trófico da <i>Glossina morsitans morsitans</i>	26
1.4 - Morfologia, Fisiologia e Biologia das Glossina.....	29
1.4.1 - Morfologia Externa dos Adultos.....	29
1.4.1.1 – Características gerais.....	29
1.4.2 - Anatomia Interna das Glossinas Adultas.....	41
1.4.2.1 - Sistema Digestivo.....	41
1.4.2.1.1 - Picada, Ingestão de sangue, digestão e assimilação sanguínea.....	44
1.4.2.2 - Ciclo Alimentar.....	46
1.4.2.3 - Sistema circulatório.....	49
1.4.2.4 - Sistema neuro-endócrino.....	49
1.4.2.5 - Aparelho reprodutor.....	49
1.5 - Relação Endosibionte com a Glossina.....	51
1.6 - O Ciclo de Vida.....	52
1.6.1 – Criadouros.....	58
1.6.2 - Fase de Adulto.....	59
1.6.3 - Duração da vida.....	60
1.6.4 - Proporção sexual.....	60
1.6.5 - Causas de morte.....	61
1.7 - Interesse para a Medicina.....	62

1.7.1 - Doença do sono ou Tripanossomíase Humana Africana.....	62
1.7.2 - Sistemática do <i>Tripanossoma brucei</i>	63
1.7.3 - Características do <i>Tripanossoma brucei</i>	63
1.7.4 - Variação Antigénica das Glicoproteínas “Variant Surface Glycoprotein” (VSG).....	64
1.7.5 - Ciclo de Vida Do <i>Tripanossoma spp.</i>	66
1.7.6 - Contacto Glossina-Homem.....	68
1.7.7 – Epidemiologia.....	69
1.7.8 - Patologia da doença-causas, incidência e factores de risco.....	72
1.7.8.1 - Progressão e sintomas.....	72
1.7.8.2 - Diagnóstico e tratamento.....	74
1-9 - Incidência da Tripanossomíase na Produção Animal em África.....	76
1.10 - Recrudescência das Tripanossomíases africanas.....	77
1.11 - Estratégia de Controlo e Prevenção.....	78
1.11.1 - Telas e Armadilhas.....	82
1.11.2 - Prevenção e Estratégias.....	83
1.12 – Objectivos do trabalho.....	85
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	86
2.2 - MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO.....	87
2.2.1 - <i>Glossina morsitans morsitans</i> Westwood, 1850 (Díptera, Glossinidae).....	87
2.3 - Principais técnicos de manutenção da colónia de <i>G. m. morsitans</i>.....	88
2.3.1 - Instalações e condições ambientais.....	88
2.3.2 - Técnicas de alimentação.....	88
2.3.3 - Técnicas de engaiolamento dos adultos e recolha das pupas.....	89

2.3.4 - Técnica de acondicionamento das pupas.....	90
2.3.5 - Técnica da recolha dos adultos eclodidos.....	91
2.3.6 - Regras de higiene e segurança para a manutenção da colónia.....	92
2.4 – Amostra.....	94
2.4.1 - Colónia de <i>Glossina morsitans morsitans</i> utilizada como amostra no estudo.....	94
2.4.2 – Metodologia utilizada na formação das três gerações.....	95
2.4.3 – Metodologia utilizada para o estudo do <i>sex ratio</i> da “Colónia Experimental” de glossinas.....	96
2.4.4 – Metodologia utilizada para recolha de amostras de glossinas a utilizar no estudo da análise molecular.....	96
2.5 - Análise molecular dos exemplares de <i>Glossina morsitans morsitans</i> Westwood, 1850.....	97
2.5.1. – Amostras utilizadas.....	97
2.5.2. – Extração do ADN genómico.....	97
2.5.2.1 – Principio do método.....	97
2.5.2.2 – Metodologia	98
2.5.3. – Amplificação do ADN genómico.....	99
2.5.4. – Electroforese em gel de agarose.....	100
2.5.5. – Purificação e sequenciação dos produtos amplificados.....	101
2.5.6 - Análise das sequências.....	101
3-RESULTADOS.....	102
3.1 – Introdução.....	103
3.2 - Estudos de glossinas eclodidas macho e fêmea por geração.....	104
3.2.1 – Primeira geração.....	104
3.2.2 – Segunda geração.....	106

3.2.3- Terceira geração.....	107
3.3 – Estudo das glossinas macho e fêmea eclodidas e de pupas não eclodidas por geração.....	109
3.3.1 – Relação de glossinas macho eclodidas por geração.....	109
3.3.2 – Relação de glossinas fêmeas eclodidas por geração.....	110
3.3.3 - Relação de pupas não eclodidas por gerações.....	111
3.3.4 – Relação das glossinas macho e fêmea eclodidas e pupas não eclodidas nas três gerações estudadas.....	112
3.3.5 – Cálculos para as glossinas machos e fêmeas eclodidas.....	113
3.4 – Estudos da análise molecular das <i>Glossinas morsitans morsitans</i> Westwood, 1850.....	114
3.5. – Selecção das amostras.....	114
3.6. – Análise molecular das amostras	114
3.6.1. – Amplificação do gene COI do ADN mitocondrial (mtDNA).....	114
3.6.2. – Sequenciação das amostras amplificadas.....	115
4 – CONCLUSÕES.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
ANEXOS.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

I – INTRODUÇÃO:

FIGURA 1 - Distribuição geográfica do Grupo <i>palpali</i> (www.medicalecology.org).....	14
FIGURA 2 - Distribuição geográfica do Grupo <i>fusca</i> (www.medicalecology.org).....	16
FIGURA 3 - Mapa da distribuição geográfica da <i>Glossina morsitans</i> (preto) (FAO Corporate Documente Repository).....	20
FIGURA 4 - Representação de alguns tipos de vegetação, que servem de habitat preferencial das glossinas (Parque Nacional da Gorongosa – Moçambique).....	23
FIGURA 5 - Versatilidade de mamíferos propícios para uma refeição sanguínea da <i>Glossina morsitans</i> (Parque Nacional da Gorongosa- Moçambique).....	27
FIGURAS 6 e 7 - <i>Glossina morsitans morsitans</i> (colónia do IHMT - Fotos da autora).....	30
FIGURA 8 - Cabeça da glossina (www.answers.com).....	31
FIGURA 9 - Diagrama da cabeça (FAO Corp. Doc. Repository).....	31
FIGURA 10 - Arista da glossina (www.answers.com).....	32
FIGURA 11 - Arista e probóscis (Foto da autora).....	32
FIGURA 12 - Representação da armadura bucal (FAO Corp. Doc. Repository).....	33

FIGURA 13 - Representação de uma asa de glossina (www.answers.com).....	35
FIGURA 14 - Pata de uma glossina. (FAO Corp. Doc. Repository).....	36
FIGURA 15 - Representação do abdómen da <i>Glossina morsitans morsitans</i> (FAO Corp. Doc. Repository) e (Foto da autora- IHMT).....	37
FIGURA 16 - Características da genitália masculina do <i>Grupo morsitans</i> (FAO Corp. Doc. Repository).....	39
FIGURA 17 - Esquema da genitália feminina (FAO Corp. Doc. Repository).....	40
FIGURA 18 - Sistema digestivo da glossina (FAO Corp. Doc. Repository).....	41
FIGURA 19 - Representação de duas glossinas: A- glossina após refeição sanguínea; B – glossina em jejum/faminta. (Adaptado de FAO Corp. Doc. Repository).....	45
FIGURA 20 - Aparência do abdómen nos diferentes estados de fome, na esquerda vista lateral, na direita vista abdominal. (FAO Corp. Doc. Repository).....	46
FIGURA 21 - Estômago de uma glossina com <i>Wigglesworthia glossinidia</i> (Foto de S. Aksoy).....	51
FIGURA 22 - Ciclo de vida da <i>Glossina spp</i> (FAO Corp. Doc. Repository).....	52
FIGURA 23 - Pupas e glossinas tenerais (Foto da autora).....	52
FIGURA 24 - Representação do ciclo de vida da glossina (Disciplina de Entomologia Prof. Doutor A. Santos Grácio).....	54
FIGURA 25 - A - Larva; B - Início da formação da pupa (s/ movimentos); C - Pupa (Foto da autora).....	55

FIGURA 26 - A - Pupa; B - pré-eclosão da glossina (FAO Corp. Doc. Repository).....	56
FIGURA 27 - Pré-eclosão de uma glossina (Foto da autora) –IHMT.....	56
FIGURAS 28 e 29 - Glossina adulta (IHMT) / (Fotos da autora).....	59
FIGURA 30 - Mapa da representação geográfica da presença do <i>Tripanosoma brucei</i> (www.medicalecology.org).....	62
FIGURA 31 - <i>Tripanosoma brucei</i> (www.dpd.cdc.gov).....	63
FIGURA 32 - Representação de formas do Tripanossoma (FAO Corp. Doc. Repository).....	63
FIGURA 33 - Esquema gráfico do efeito da VSG numa infecção por tripanossoma...	65
FIGURA 34 - Ciclo de vida do <i>Tripanossoma spp</i> (CDC).....	66
FIGURA 35 - Na África Oriental, a glossina do <i>Grupo morsitans</i> é o vector do parasita <i>T. b rhodesian</i> para o homem e animais. (adaptado de (FAO Corp. Doc. Repository).....	68
FIGURA 36 - “A doença do sono”- THA - (CDC 1996).....	72
FIGURA 37 - A Tripanossomíase Africana Animal (FAO/IAEA Programe).....	76
FIGURA 38 - Armadilha viva utilizando animais (Tsetse.FAQ).....	80
FIGURA 39 - Ronda de captura (Tsetse.FAQ).....	80
FIGURA 40 - Veículo patrulha (Tsetse FAQ).....	81
FIGURA 41 - Diferentes tipos de armadilhas para a captura de glossinas (Tsetse FAQ).....	82

FIGURA 42 - Formação (Tsetse FAQ).....	83
---	-----------

FIGURA 43 - Diferentes tipos de armadilhas artesanais. (Tearfund Int. Learning Zone).....	83
--	-----------

II - MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 44 - Colónia de <i>G. morsitans morsitans</i> Westwood, 1850, Insectário da UEM/IHMT. (Foto da autora).....	87
---	-----------

FIGURA 45 - Gaiola para glossina macho IHMT (Foto da autora).....	89
--	-----------

FIGURA 46 - Registo protocolar numa gaiola (Foto da autora - IHMT).....	89
--	-----------

FIGURA 47 - Gaiola de glossinas. (Foto da autora - IHMT).....	90
--	-----------

FIGURA 48 - Larvas e pupas (Fotos da autora - IHMT).....	91
---	-----------

FIGURA 49 - Acondicionamento de pupas (Fotos da autora - IHMT).....	91
--	-----------

FIGURA 50 - Frascos com pupas para a formação da “Colónia Experimental”. (Foto da autora – IHMT).....	91
--	-----------

FIGURA 51 - Eclosão de glossinas (Foto da autora - IHMT).....	92
--	-----------

FIGURA 52 - Transferência para uma gaiola de uma glossina teneral, utilizando um tubo de ensaio. (Foto da autora - IHMT).....	92
--	-----------

FIGURA 53 – A formação da “Colónia Experimental”.Gaiolas com glossinas e frascos com pupas de 1ª geração em baixo e 2ª geração (pupas) em cima. (Foto da Autora - IHMT).....	95
---	-----------

FIGURA 54 - Homogeneização das amostras.....98

**FIGURA 55 - Visualização do gel de agarose a 1% dos produtos da PCR para o gene COI de algumas das amostras da população de *G. morsitans morsitans*.
CN - controlo negativo, 1-12 - amostras da população das *G.m.m*.....114**

FIGURA 56 - Alinhamento das sequências nucleótídicas parciais analisadas para o gene COI do ADN mitocondrial.....115

FIGURA 57 - Alinhamento das sequências nucleótídicas parciais das amostras de *G.m.morsitans* com a sequência de referencia EF 531200.1 (*G. morsitans*), obtida a partir do GenBank.....118

ÍNDICE DE TABELAS, GRÁFICOS E QUADROS:

I – INTRODUÇÃO:

TABELA 1 - Diferentes características para o reconhecimento da mosca teneral e não teneral.....	48
--	-----------

TABELA 2 - Tabela representativa de THA e Nagana, sua distribuição geográfica e os diferentes vectores. (Adaptação de FAO Corp. Doc. Repository).....	70
---	-----------

II – MATERIAL E MÉTODOS:

TABELA 3 - Sequência nucleotídica e o gene alvo utilizados no presente trabalho....	99
--	-----------

GRÁFICO 1 - Representação gráfica de glossinas macho e fêmea eclodidas e de pupas não eclodidas na 1ª geração.....	104
---	------------

QUADRO 1 - Totais e percentagens de glossinas e pupas na 1ª geração.....	105
---	------------

GRÁFICO 2 - Representação gráfica de glossinas macho e fêmeas eclodidas e de pupas não eclodidas na 2ª geração.....	106
--	------------

QUADRO 2 - Totais e percentagens de glossinas e pupas na 2ª geração.....	106
---	------------

GRÁFICO 3 - Representação gráfica de glossinas macho e fêmea eclodidas e de pupas não eclodidas na 3ª geração.....	107
---	------------

QUADRO 3 - Totais e percentagens de glossinas e pupas na 3ª geração.....	108
---	------------

GRÁFICO 4 - Representação gráfica das glossinas macho eclodidos nas três gerações.....	109
---	------------

GRÁFICO 5 - Representação gráfica das glossinas fêmea eclodidas nas três gerações.....	110
GRÁFICO 6 - Representação gráfica de pupas não eclodidas nas três gerações.....	111
GRÁFICO 7 - Representação das três gerações de glossinas fêmea e macho eclodidas e de pupas não eclodidas.....	112
TABELA 4 - Total e percentagem das glossinas nas três gerações.....	113

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg - Micrograma

µl – Microlitro

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

COI – Citocromo C oxidase sub-unidade 1

BLAST - Basic Local Aligment Search Tool

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

IHMT – Instituto de Higiene e de Medicina Tropical

MCT – Missão de Combate às Tripanosomíases

MHS – Means HungerStage – estado alimentar médio

LCR - Líquido Cefaloraquidiano

mt DNA – DNA mitocondrial

NT - .Não teneral

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Polymerase Chain Reation

PTI – Tsetse Throbin Inhibitor

rpm – Rotações por minuto

SI – Sistema Imunitário

RS - .Refeição sanguínea

TAA – Tripanossomíase Animal Africana

TAE - Tris-Acetato

TE - Tris-EDTA

THA - Tripanossomíase Humana Africana

UEM – Unidade de Entomologia Médica

UV – Ultravioleta

VAT - Variable Antigen Type

VSG - Variable Surface Glicoprotein

WHO - World Health Organization

RESUMO

Com esta dissertação, pretendemos contribuir para um melhor conhecimento dos aspectos entomológicos da *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850, existente no insectário da Unidade de Entomologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UEM/IHMT), e para o início do estudo da sua análise molecular.

A dissertação está dividida em quatro partes e inclui ainda uma lista de siglas, abreviaturas, índices de figuras, tabelas, gráficos e quadros, assim como anexos que se julgou pertinente incluir.

A INTRODUÇÃO, consiste na primeira parte do trabalho, fazendo-se nela uma abordagem sobre o historial da mosca tsétsé, a nagana, a Tripanossomíase Humana Africana (THA) e a contribuição portuguesa para o seu estudo e também para o combate tanto da doença como para o combate do vector.

Referimo-nos aos aspectos da sistemática, da distribuição geográfica e de alguns factores condicionantes, como o habitat, o comportamento trófico das glossinas, a morfologia, a fisiologia e a bioecologia dos vectores.

São também abordados alguns aspectos de interesse em medicina dos agentes patogénicos e as suas relações inter hospedeiros vertebrados e modo de transmissão.

Ainda neste capítulo referimos a importância da metodologia na luta contra os vectores, integrada no controlo das tripanossomíases africanas.

Na segunda parte, MATERIAL E MÉTODOS, descrevemos o modelo experimental utilizado na nossa amostra, destacando a origem, as características e as técnicas de manutenção.

São descritos os materiais, as técnicas e as metodologias utilizadas para a extracção e amplificação do Ácido Desoxirribonucleico (ADN) genómico, seguindo-se a purificação e sequenciação dos produtos amplificados.

Na terceira parte, RESULTADOS, apresentamos os diferentes estudos realizados e resultados obtidos, durante a formação da colónia de glossinas que são utilizadas como amostra para o estudo, podendo apresentar a relação *sex ratio*, o número de glossinas adultas eclodidas macho e fêmea, assim como o número de pupas. Ainda neste capítulo apresentamos a análise molecular das amostras e a sua sequenciação.

Na quarta parte, descrevemos as CONCLUSÕES, gerais do trabalho, onde se demonstra que o *sex ratio* das *Glossinas morsitans morsitans*, criadas em colónia é idêntico ao existente no seu habitat natural e que a sua diversidade haplotípica é extremamente baixa.

A última parte, é constituída pelas REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS consultadas para esta dissertação

ABSTRAT

With this essay we try to contribute for a better knowledge of the entomological aspects pertaining to the *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850, existing in the UEM/IHMT insectariums, and the beginning of the study of its molecular analysis.

The essay is divided in four parts and includes a list of initialisms, abbreviations, figure indexes, tables and graphics as well as annexes that were deemed important to include.

The INTRODUCTION is the first part of this paper, and on it, an approach is made about the Tsetse fly, the “nagana”, the Human African Trypanosomiasis (HAT) and the historical Portuguese contribution for its study and also for the combat not only against the disease but also against its vector.

We refer the systematics aspects, the geographic distribution and some conditioning factors such as, habitat glossinae’s trophic behaviour, the morphology, the physiology and the vectors bioecology.

Some interesting aspects for medicine are also approached, in what concerns the pathogenic agents and their vertebrate hosts as well as means of transmission.

Still in this chapter we mention the importance of methodology on the struggle against the vectors, integrated on the control of African trypanosomiasis.

On the second part, MATERIAL AND METHODS, we describe the experimental method that it was used on our specimen, highlighting the origin, the characteristics and maintenance techniques.

It is also described the materials, techniques and methodologies that were used for the extraction and amplification of the genomic DNA (Deoxyribonucleic Acid), following it up with the purification and sequencing of the amplified products.

On the third part, RESULTS, we present the different studies that were done and the results obtained, during the formation of the glossinae's colony that is used as specimen for the study, being able to present the *sex ratio* as well as the number of hatched adult glossinae, male and female, and the number of pupae. Still on this chapter we present the specimens molecular analysis and its sequencing.

On the fourth part, we mention the general CONCLUSIONS taken from this work, where it is demonstrated that the *Glossina morsitans morsitans sex ratio*, bred in colony, is identical to the existing one on its natural habitat and that its haplotypal diversity is extremely low.

The last part consists on the BIBLIOGRAPHIC REFERENCES consulted for this essay.

I – INTRODUÇÃO:

1.1 - Mosca Tsé-Tsé, Doença do Sono e Nagana.

Mosca Tsétsé, no dialecto banto na África Equatorial, é o nome de uma mosca que transmite a doença do sono ao homem, a Tripanossomose Humana Africana (THA) e a doença, conhecida como Nagana, quando afecta os animais, doenças estas, causadas pelo parasita: *Trypanosoma spp.*

Apesar do termo mosca Tsétsé ter a sua origem na África Equatorial, foi transmitido ao longo dos tempos por todos os povos africanos que se defrontavam com os mesmos problemas nas suas aldeias, tanto por provocar a doença nos seus habitantes, como nos animais domésticos, ficando até aos dias de hoje como nome usual nas gentes daquele continente.

É também muito conhecida por todos os povos africanos como a mosca de “caça”e ou “mosca das savanas”.

Na linguagem científica é denominada por *Glossina*, com diferentes características quanto ao Grupo, Género e Subgénero.

Tsétsé, mosca de caça, mosca de savana ou simplesmente glossina é um flagelo grave que assola muitos países africanos e é um dos principais responsáveis pela doença e pela economia precária nas zonas rurais onde a sua presença é notória. Esta situação é provocada pela transmissão do parasita aos seus hospedeiros (homem ou animal), no momento da sua refeição sanguínea, razão para grandes deslocações de populações de áreas onde a doença grassava para áreas que poderiam estar menos infestadas.

1.1.1 - Breve história da *Glossina* e da doença do sono:

Esta mosca era já há muito conhecida por todos os povos africanos, e as primeiras referências são feitas por um geógrafo árabe Abu Yaqut durante a sua viagem em África, no Século XII. No entanto, foi só no séc. XIV que um escritor árabe Ibn Khaldun menciona a morte lenta e dolorosa do sultão Mali Jata por ter sido picado por uma mosca, julgando-se assim que haveria uma relação entre a doença e a mosca (De Kruit, P. 1926)

A chegada dos europeus a África e a consequente exploração em zonas infestadas por esta mosca, fez com que John Atkins, em meados do séc XVIII, denominasse a doença existente como “Negro letargi”, sem contudo identificar a sua patogenia.

Anos mais tarde, em 1830, é que Wideman descreve a mosca conhecida por tsétsé como glossina, passando então esta a fazer parte do Género *Glossina*.

Em 1880, apesar de ser já conhecido o Género *Trypanosoma* e de que este era o causador da doença então chamada “surra” dos cavalos e outros animais domésticos, não era no entanto uma doença que estivesse relacionada com a glossina.

Devido a descobertas posteriores deste parasita no sangue de bovinos, por Bruce e Mary Bruce em 1894, na África do Sul, deu-se início a diferentes investigações

científicas e, em 1897, Bruce observando tripanossomas no estômago de glossinas, fez a primeira associação entre Nagana, a Tripanossomíase nos animais e o insecto *Glossina*.

Em 1898, a doença e a morte começou a espalhar-se pela África Central, junto ao Lago Victoria Nyanza e, principalmente, no Uganda até ao início do século XX.

Centenas de milhares de homens e mulheres morreram devido à doença do sono africana, sendo esta data considerada como a primeira epidemia.

Em 1899, Plimmer e Bradford, por terem observado o parasita flagelado num cão, deram-lhe então o nome de *Trypanosoma brucei*

Em 1901, Robert Michael Forde fez a primeira observação de tripanossomas em sangue humano, que tinha vindo da Gâmbia.

Em 1903, Aldo Castellani relacionou que os tripanossomas que observou (*Trypanosoma gambiense*) num paciente, estariam implicados na patógenese da doença do sono, sem contudo a relacionar com a picada da glossina ou que esta fosse o vector do parasita.

Contudo, estavam já dados os primeiros passos para que, observações feitas durante os anos seguintes, concluíssem finalmente que a doença do sono ou Tripanossomíase Humana Africana (THA) fosse então considerada e reconhecida.

Isto aconteceu quando, em 1911, na Rodésia (actual Zimbabwe), Stephens e Fantham observaram tripanossomas num homem de raça branca, dando ao parasita responsável o nome de *Trypanosoma rhodesiense*.

A maior epidemia da doença do sono dá-se entre 1896 e 1908, e foram calculados que cerca de 500 mil pessoas morreram na Bacia do Congo e cerca de 300 mil em Busoda, Uganda (Cox, 2004).

Uma outra expansão epidémica, nos inícios de 1920 até 1940, deu-se no Senegal, estendendo-se aos Camarões.

A mais recente epidemia em África, ocorreu em 1980.

1.1.2 - O Papel de Portugal no estudo da doença e das glossinas:

Portugal, como país colonizador, nomeadamente da Guiné-Bissau, S. Tomé e Príncipe, Cabo Verde, Angola e Moçambique, teve um papel preponderante em todos os estudos relacionados com a patologia desta doença, que era então desconhecida em África, assim como com o estabelecimento de que a responsabilidade da transmissão da doença estava relacionada com a *Glossina spp* (Silva Correia., 1923 & Rebelo, A., 1938).

Portugal teve também um papel preponderante no controlo, tanto da doença, como do vector.

Embora os primeiros colonizadores tenham estado muitas das vezes em contacto com tão grande problema, apenas se sabia que em determinadas zonas existia uma mosca que os nativos denominavam de tsétsé e que dizimava o gado.

Os portugueses foram os primeiros europeus a sofrer as consequências da tsétsé. A expedição do governador e capitão-general Francisco Barreto, pelo vale do Zambeze em demanda das minas do Monomotapa, no século XVI, teve consequências graves, devido à perda de todos os cavalos e outros animais utilizados para o transporte de materiais (Andrade e Silva, 1956).

Uma vez que nesta dissertação falaremos da *Glossina morsitans morsitans*, e como a sua localização geográfica é a África Oriental, faremos uma abordagem do papel que os cientistas portugueses tiveram no estudo e combate da doença e da mosca em Moçambique.

É de salientar, porém, que foi em 1874 que A. Sócrates da Costa descreveu pela primeira vez a doença do sono em território português (Guiné).

As primeiras referências à tsétsé em Moçambique (1838) constam dos relatos da viagem de Louis Trichardt em direcção a Lourenço Marques, “encontrando a mosca que matava o gado” junto a afluentes do rio Limpopo e do rio Incomati (M.A. Andrade e Silva, 1936).

Em 1901, Portugal iniciou campanhas contra a doença do sono, sendo o primeiro País a desencadear esta luta que tinha, na altura, como objectivos, o controlo da tripanossomíase animal e o seu tratamento, bem como a luta contra o vector, uma vez que em Províncias como Niassa, Manica e Sofala, as tripanossomoses afectavam mais de dois terços do território

O primeiro caso relatado e detectado em Moçambique foi em 1909, por Rola Pereira.

Em 1912, foi criado o Serviço de Defesa Contra a Doença do Sono, com postos sanitários localizados em diversas áreas do território, como consequência dos resultados obtidos em grupos de missão feitas na Província de Tete e de Quelimane, por Firmino Sant'Ana e outros investigadores.

Em 1936, é descoberto um foco de tripanossomíase humana numa das manchas de glossinas do Zumbo, que tinha sido dada como não infectada em 1931.

Este facto, segundo António Rebelo (1938), (e com quem tive a honra de trabalhar anos mais tarde), percorreu durante quatro anos as zonas de focos glossínicos para o estudo da doença do sono no Distrito de Tete, afirmando o seguinte, *".....que esse facto deveu-se ao alastramento contínuo de uma mancha de glossinas da Rodésia do Sul para as terras do Zumbo situadas na margem direita do Zambezeacabar por invadir toda a circunscrição da Chicó e depois toda a parte do distrito ao sul do Zambeze se não se tomarem medidas preventivas energéticas.....esta nova invasão de glossinas se deve ao persistente e aturado combate que na Rodésia do Sul se tem feito ao flagelo por meio do extermínio e da perseguição da caça, donde resultou terem atravessado a fronteira grande quantidades de animais selvagens e, consequentemente, de glossinas."*

Em 1940, foi criada a Missão da Doença do Sono e em 1945, a Missão de Combate às Tripanossomíases (MCT).

Portugal, foi também pioneiro na instalação laboratorial, criação e manutenção de uma colónia de glossinas em 1957 (Azevedo & Pinhão, 1964; Afonso, 2000).

Moçambique, em 1966, dispunha já de oito hospitais e onze postos sanitários específicos para a doença do sono.

Após a independência de Moçambique a MCT foi extinta e integrada no Serviço Nacional de Saúde e no Serviço de Sanidade Animal (Davies, 1983).

1.1.3 – O papel da Organização Mundial da Saúde e do Mundo na actualidade - o regresso da doença do sono:

Nas últimas décadas o Mundo tem ouvido notícias acerca do regresso assustador de diversas doenças endémicas e epidémicas, entre elas a Tripanossomíase Humana Africana, que desde há muito era considerada uma doença de muito pouca importância devido ao facto de já não se registarem episódios, é hoje considerada uma doença emergente. Hoje há notícias reveladoras que, através de diferentes meios de comunicação, nos transmitem que a doença do sono se tornou um novo flagelo.

“Angola, segundo país com mais doença do sono”

“19.000 casos da doença do sono no Zaire”

“A OMS desenvolve estratégias para Controlo da doença do sono em África”

“OMS quer eliminar doença do sono em África até 2015”

“A República Democrática do Congo (ex – Zaire) encabeça a lista de países mais afectados com a doença do sono”

“Uganda e o Sudão, com forte prevalência de THA”

A Tripanossomíase Humana Africana requer medidas urgentes a tomar a diversos níveis, tanto no combate à mosca e consequentemente à doença, como medidas que têm que ser implementadas para a prevenção da doença.

Segundo a OMS (2005), a doença do sono passou a estar sob controlo em África nos princípios da década de 1960, quando a prevalência foi reduzida para níveis baixos, de menos de um caso por 10.000 habitantes, através da detecção de nódulos linfáticos, tratamento adequado, controlo dos vectores e utilização de equipas móveis.

No entanto, estes resultados não puderam ser mantidos, pois abandonou-se a vigilância regular e sistemática – pedra angular do controlo da doença do sono – devido à falta progressiva de pessoal qualificado, a perturbações políticas e problemas económicos, bem como à alteração das prioridades políticas nacionais, levando a uma atribuição de menos recursos ao sector da Saúde.

Calcula ainda a OMS que a doença do sono afecta entre 300.000 a 500.000 pessoas na chamada “cintura da tsétsé”, área que cobre cerca de dez milhões de quilómetros quadrados e que se estende do Senegal, na África Ocidental, passando por toda a África Central e Oriental.

Um outro problema associado é a Nagana ou a Tripanossomíase Animal Africana (TAA), que tem um grave impacte sobre a agricultura, provocando perdas anuais na produção de gado equivalentes a mais de US\$ 1 bilião (OMS, 2005).

Hoje, o número estimado é de 60 milhões de pessoas em 35 países endémicos da África a Sul do Saara, que a ameaça da doença do sono pode pôr em risco.

Segundo o investigador em microbiologia Derrick Robinson, cujos trabalhos foram publicados na Revista PloS Biology, entre 50.000 a 70.000 pessoas estão actualmente infectadas em 36 países africanos (Lusa, Maio 2008).

1.2 - SISTEMÁTICA DAS GLOSSINAS.

1.2.1-Posição Sistemática do Género *Glossina* Wiedeman, 1830:

Segundo Frederik Torp Petersen, (2007), num artigo sobre Filogenia Molecular e Evolução, a **Superfamília Hippoboscoidea**, é composta por quatro Famílias:

Família Glossinidae

Família Hipoboscidae

Família Streblidae

Família Nycteribidae

Estas Famílias exibem um grande número de adaptações únicas e importantes quer morfológica quer fisiológica, estão associadas ao seu estilo de vida ectoparasitário (Henning, 1973;McAlpine,1989).

O conceito moderno da Hippoboscoidea é determinado e comprovado por análises genéticas, usando dados sequenciais de ADN. (Nirmala *et al*; 2001, Dittmar *et al*, 2006).

Família Glossinidae:

Durante vários anos, e segundo investigadores como VanderplanK (1949), consideravam que o Género *Glossina* pertencia à Família Muscidae e na Subfamília Stomoxyinae ou a uma outra Subfamília Glossininae.

Foi a partir dos anos cinquenta que as glossinas foram consideradas como uma família monogenética e pertencentes à Família Glossinidae (Afonso, 2000).

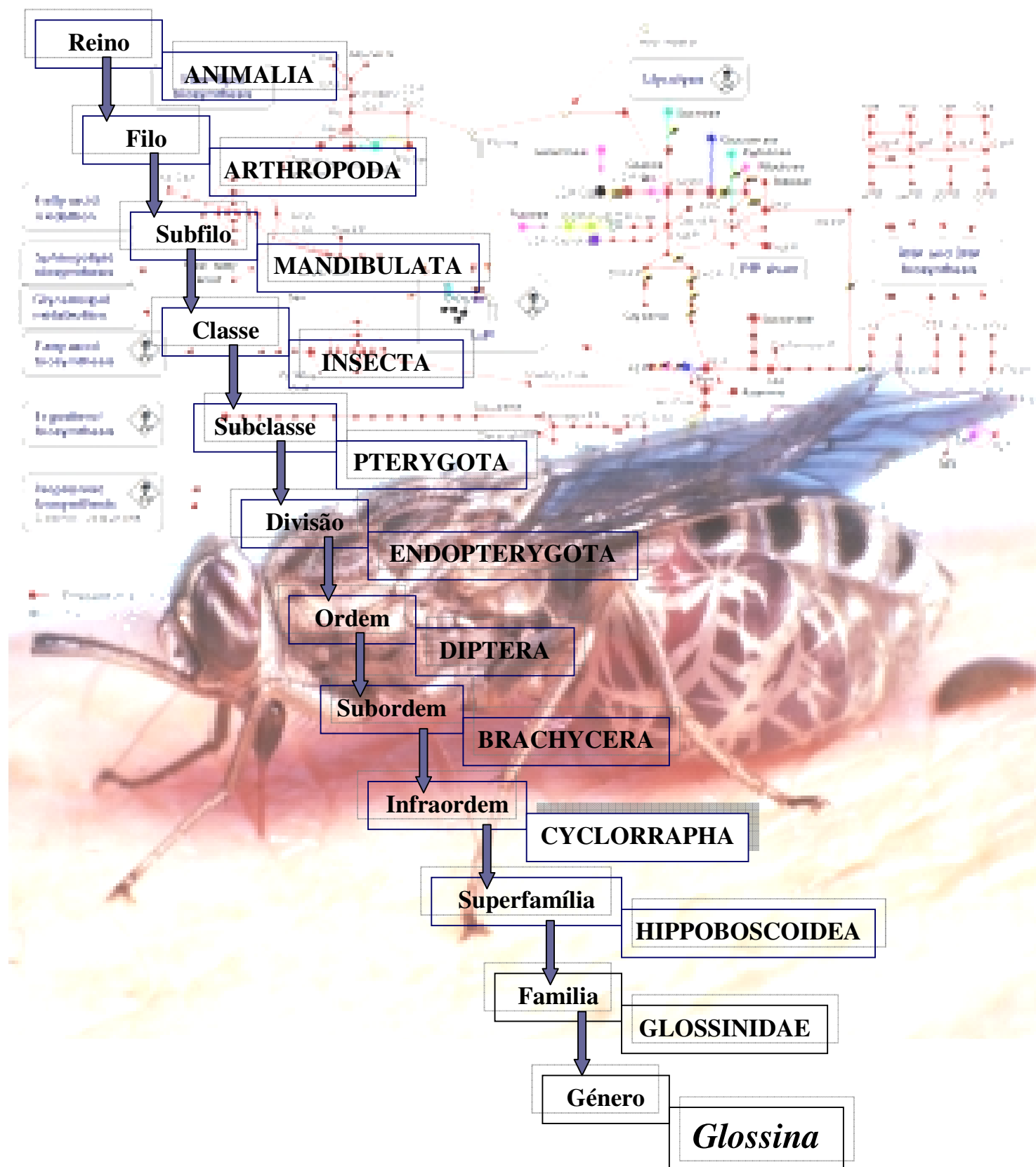
As Glossinidae são de todas as Famílias a que apresenta um número menor de espécies, mas é também a mais conhecida devido à sua notoriedade como vector dos parasitas tripanosomas, responsável pela doença do sono em humanos e Nagana em animais (Krinsky, 2002)

Morfologicamente é a menos modificada da Superfamília Hippoboscoidea, embora mantendo muitas das características ancestrais das Calyptratae.

A monofilia das Glossinas é aceite, (Hennig 1973) e reafirmada por um número de sinapomorfias em McAlpine (McAlpine, 1989: e.g. arista com longas plúmulas, palpos alongados e probóscis).

As características mais importantes, que as diferem das outras três famílias, são que as glossinas têm vida livre e só entram em contacto com o hospedeiro durante as refeições sanguíneas. A mais notável de todas é a sua viviparidade adenotrófica

1.2.2 - Cronograma da Posição Sistemática do Género *Glossina*, Wiedeman, 1830:



1.2.3 - Género *Glossina* Wiedeman, 1830:

1.2.3.1-Espécies e Subespécies:

No âmbito do estudo de espécies e subespécies, deparamo-nos com três grandes Subgéneros, de que iremos apenas fazer uma pequena abordagem, unicamente para que possamos localizar e compreender melhor a espécie e subespécie que nos importa para este estudo.

Assim, teremos e segundo os autores, (Machado, 1970; Glasgow, 1970; Pont, 1980; WHO, 1986; WHO, 1998 e Afonso, 2000):

1.2.3.1.1- Subgénero *Nemorhina* Robineu-Desvoidy, 1830:

(Grupo *palpalis*)

Espécie e subespécie

Glossina palpalis palpalis

Glossina palpalis gambiensis

Glossina tachinoides

Glossina fuscipes fuscipes

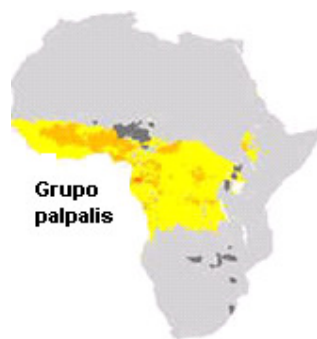


Fig nº1-Distribuição geográfica do Grupo *palpalis*

(www.medicalecology.org)

Neste grupo encontram-se algumas das glossinas cuja principal característica é a sua distribuição ser em zonas muito húmidas da África Ocidental e Central.

O habitat destas glossinas é a floresta tropical húmida, onde este grupo de glossinas pode ser encontrado e estão associadas à vegetação típica nas margens de rios, lagos, pântanos, distribuindo-se ao longo dos cursos de água nas chamadas galerias florestais.

Durante a época seca podem ser encontradas em refúgios mais húmidos junto ao solo onde repousam, permitindo assim a sua sobrevivência.

Estas glossinas são consideradas espécies higrófilas, não só pela presença da água, mas também pela necessidade da vegetação típica que lhes dá abrigo.

1.2.3.1.2 - Subgénero *Glossina* s.str. Zumpt, 1935:

(Grupo *morsitans*)

Espécie e subespécie	Autor e data
<i>Glossina longipalpis</i>	Wideman, 1830
<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Westwood, 1850
<i>Glossina morsitans centralis</i>	Machado, 1970
<i>Glossina morsitans submorsitans</i>	Newstead, 1910
<i>Glossina pallidipes</i>	Austen, 1903
<i>Glossina austeni</i>	Newstead, 1912
<i>Glossina swynnertoni</i>	Austen, 1923

Este é o Grupo alvo do nosso estudo, sendo a Espécie a *Glossina morsitans morsitans*, cujas características serão estudadas pormenorizadamente ao longo de todos os capítulos seguintes.

1.2.3.1.3 - Subgénero *Austenina* Townsend, 1921:

(Grupo *fusca*)

Espécie e subespécie

Glossina fusca fusca

Glossina fusca congolensis

Glossina longipennis

Glossina brevipalpis

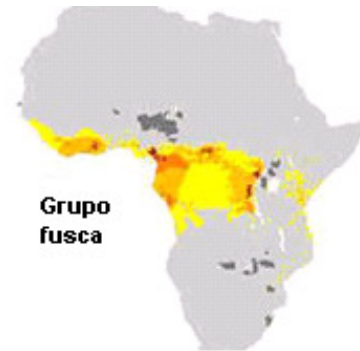


Fig nº2 - Distribuição geográfica do Grupo *fusca*

(www.medicalecology.org)

Este grupo tem como característica ter o seu habitat geralmente associado a floresta pluvial ou as margens florestais da África Ocidental, coincidindo muitas vezes com a área de distribuição do Grupo *palpalis*.

No entanto, neste grupo há glossinas que ocupam áreas semi-áridas e mesmo áridas, como por exemplo a *Glossina longipennis*, e *Glossina brevipalpis* podendo ser encontradas em zonas secas de savana da África Oriental e Meridional.

1.2.4 - Evolução dos três Grupos do Género *Glossina*:

A evolução dos três grupos de glossinas (*fusca*, *morsitans*, *palpalis*), segundo Bursell, nos anos cinquenta e à luz da teoria ecológica, representa o curso evolutivo das espécies do Género *Glossina*.

O Grupo *fusca* era tido como sendo o grupo mais primitivo, uma vez que as espécies deste grupo estão geralmente associadas a floresta pluvial e por ser considerado esse o seu habitat ancestral.

O Grupo *morsitans* teria sido o último a evoluir, adquirindo uma capacidade de adaptação ao aparecimento da vegetação de savana (Ford, 1970).

No entanto, existem várias outras teorias acerca da evolução dos três Grupos de Glossinas. As teorias quanto à origem, habitat e Grupo a que pertencem as glossinas foram ao longo dos anos, alvo da evolução de vários estudos científicos: ecológicos, morfológicos e genéticos.

A sua classificação na sistemática foi também evoluindo ao longo do tempo devido ao avanço da ciência, sendo actualmente os estudos através da genética a maior e mais importante ferramenta ao serviço dos entomologistas.

Apesar da ciência ter evoluído para uma melhor compreensão e estudos das diferentes espécies, há ainda muitas dúvidas, não só quanto à evolução, como quanto ao Grupo em que devem ser colocadas algumas espécies. Exemplos disto é o caso da *Glossina austeni*, que continua em debate se pertence ao Grupo *morsitans* ou se deveria ser incluída no Grupo *palpalis* (Newstead, 1912 e Afonso, 2000).

É também e no âmbito da distância genética entre as diferentes espécies de Glossinas (Gooding, 1996), assim como análises moleculares dos diferentes endossimbiontes (Aksoy *et al.*, 1997 e Dale & Maudlin, 1999), que o estudo parece indicar a seguinte evolução:

Primeiro, espécies do Grupo *fusca*, seguidas do Grupo *morsitans* e finalmente as do Grupo *palpalis*

1.3 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS GLOSSINAS.

1.3.1 - Alguns factores condicionantes:

As glossinas, como foram referidas, ocupam exclusivamente o continente africano ao Sul do Saara, tendo como limite da sua presença a Norte (15° de latitude Norte) e o limite meridional (cerca de 20° de latitude Sul).

A sua distribuição deve-se a factores abióticos, como o défice higrométrico e elevadas temperaturas registadas no deserto do Saara.

A Sul, a sua distribuição é limitada pelo deserto do Namibe, onde se verificam temperaturas muito baixas, condições estas incompatíveis com a sobrevivência das glossinas.

As grandes altitudes (2000 metros), são também factor que não favorece a sobrevivência das glossinas, devido ao abaixamento acentuado da temperatura.

Há outros factores limitantes como por exemplo os factores bióticos:

1- A vegetação, que é já uma condicionante do clima e do solo e que por sua vez cria e regula condições físicas e biológicas de temperatura e humidade, influencia a qualidade das superfícies em que a mosca pousa, a forma e dimensões dos espaços de voo, etc.

2- Outro factor não menos importante para a presença ou ausência das glossinas numa determinada área são os hospedeiros fontes de alimentação.

3- Factores condicionantes e limitantes da distribuição das espécies e subespécies, são as barreiras anatómicas, fisiológicas, biológicas e a atracção sexual das glossinas (Machado 1954 e Azevedo, 1967).

1.3.2 - Distribuição Geográfica do Grupo e Espécies da *Glossina morsitans*:

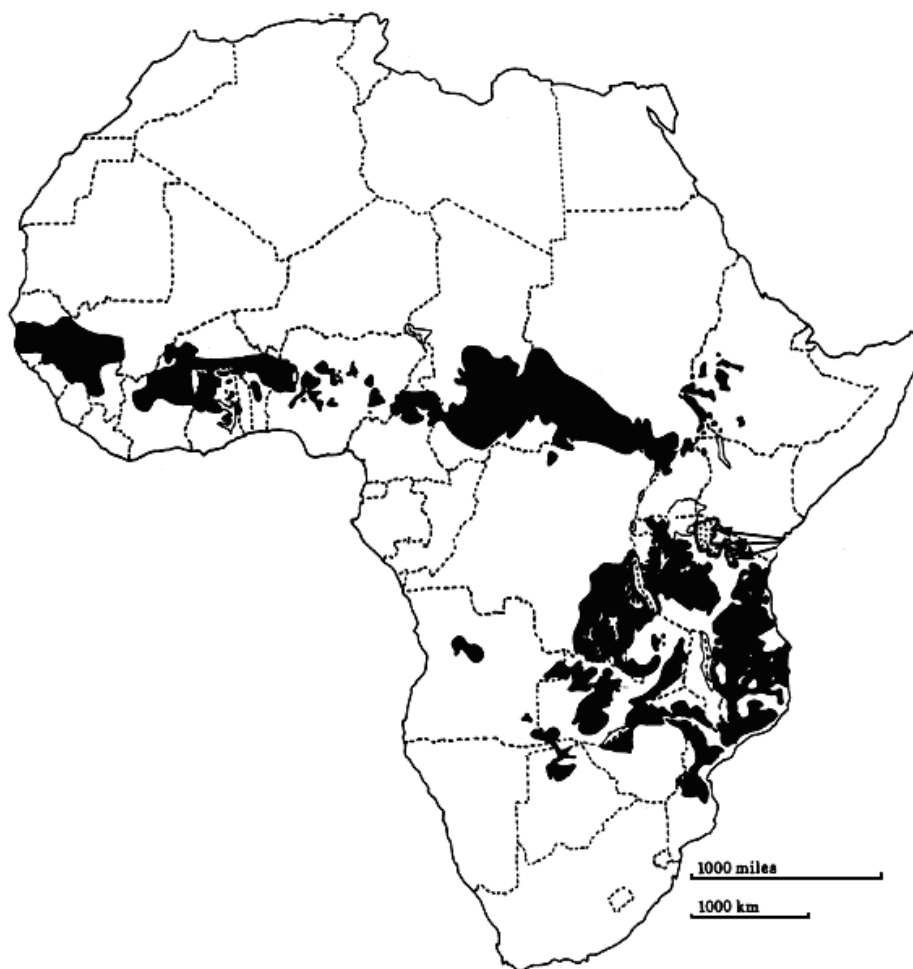


Fig.nº3 - Mapa da distribuição geográfica da *Glossina morsitans* (preto)
(FAO Corporate Documente Repository)

O Grupo *Glossina morsitans*, encontram-se por todo o lado na savana africana, sendo consideradas glossinas xerófilas.

A sua distribuição no entanto parece ser limitada pelas condições climáticas de invernos frios no Sul (Zimbabwe, Botswana) e por condições climáticas de calor seco no Nordeste e África Central.

Outro factor e não menos importante na distribuição geográfica das glossinas, é a escassez de animais de caça dos quais se alimentam, mesmo sendo zonas com condições climatéricas propícias à presença da glossina.

A *Glossina morsitans* (Mapa 1) é a mais comum das espécies. Contudo a sua distribuição não é conhecida de um modo exacto em todos os países.

1.3.2.1 - Distribuição de algumas subespécies do Grupo *morsitans*:

1 - *Glossina morsitans submorsitans* estende-se por uma grande e larga faixa que é interrompida completamente a Este, pelo Sudeste do Sudão, Nordeste do Uganda e Etiópia.

2 - *Glossina morsitans centralis* encontra-se no Zaire, Zambia, Angola, Botswana, Tanzânia, Rwanda e Burundi

3 - *Glossina morsitans morsitans* encontra-se na Tanzânia, Moçambique, Zimbabwe, Zambia e Malawi.

A fronteira que separa as duas subespécies *G. m. centralis* e *G. m. morsitans*, corresponde aproximadamente à linha onde se encontram o oceanos Atlântico e Índico.

4 - *Glossina morsitans swynnertoni* (Mapa1) está limitada ao Kenya e Tanzânia, entre o Lago Vitória e o Oceano Índico.

5 - *Glossina morsitans pallidipes* estende-se ao longo do Kenya e Somália, nas regiões costeiras, sendo abundante neste país ao longo de alguns rios. Está também presente na Etiópia, Sudão, Tanzânia, Moçambique, Zimbabwe, Zâmbia, Zaire e Uganda.

6 - *Glossina morsitans austeni* existe somente na costa este de países como Somália, Kenya, Tanzânia, Moçambique e Nordeste de algumas zonas da África do Sul.

1.3.3 – Habitat:

A glossina do Grupo *morsitans* habita geralmente as matas de “miombo”, [(floresta caracterizada por uma densa vegetação, com árvores caducifólias e semi-caducifólias, (*Brachystegia spiciformis* e *Julbernardia globiflora*), que frequentemente atingem entre 10 e 20 metros)], as associações de *Brachystegia*, as comunidades secundárias de Acácia, Combretum e Terminalia, constituindo o que se chama a “mata de savana” e também a floresta de Mopane, caracterizada predominantemente pela ocorrência de árvores e arbustos, que apresenta grandes quantidades de fauna.

As diversas condições ecológicas que se podem deparar nas regiões onde este tipo de matas predomina poderá ser um factor importante para que se afirme a existência da *Glossina* (Pires, F.A; Serviço de Veterinária – Moçambique; 1947).

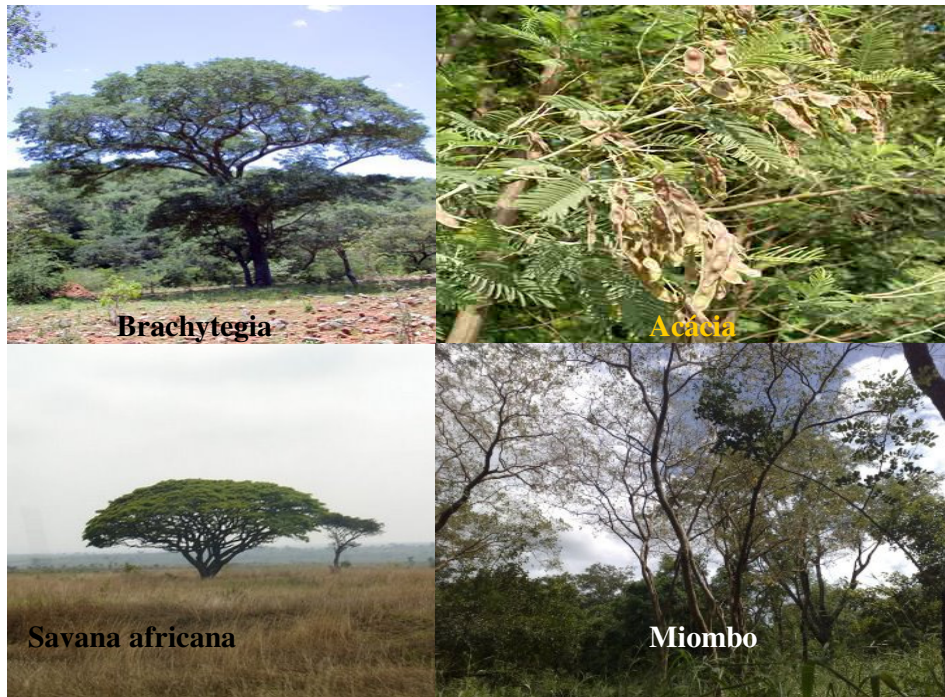


Fig. nº 4 - Representação de alguns tipos de vegetação, que servem de habitat preferencial das glossinas (Parque Nacional da Gorongosa- Moçambique).

1.3.3.1 – Alguns factores que condicionam a presença da glossina:

Factores que podem condicionar a presença da glossina, no seu habitat são a extrema variabilidade de Brachystegia- Isorberlína, também condicionada por factores climáticos diversos, a maior ou menor existência de clareiras, as características dos “capins” de cobertura e a maior ou menor densidade de animais de caça.

Há um conjunto de factores que determinam a distribuição da *G. morsitans* em determinadas faixas, que podem não apresentar uma mancha em superfície contínua, podendo com frequência constituírem-se em grupos de maior ou menor extensão.

Factores que podem variar ou modificar e influenciar o ritmo de sobrevivência das glossinas são as queimadas que influenciam a sua dispersão

É também de realçar que as queimadas, que por um lado provocam a dispersão das glossinas e o desequilíbrio nas condições ecológicas, tais como, a dispersão da caça e a protecção da cobertura vegetal que se torna precária, mas que por outro lado, são o factor, para uma retracção dos focos residuais, uma vez que, com o estabelecimento da vegetação torna a presença da glossina mais viável de ser capturada.

Factores climáticos condicionam os movimentos de fluxo e refluxo das manchas de glossinas, exercendo também uma influência considerável sobre a sua densidade populacional.

O calor da estação seca dizima quantidades avultadas de insectos adultos, destruindo grande número de pupas e fazendo baixar notavelmente o número de emergências (Rebelo, A; S. Saúde – Moçambique, 1938).

Sendo assim, a glossina não tem assegurado os seus repastos a intervalos regulares; o calor; a secura e os seus esforços para encontrar alimentação desequilibram-lhe o balanço hídrico e grande parte morre.

1.3.4 – Comportamento trófico da *Glossina morsitans morsitans*:

O conhecimento das preferências alimentares das glossinas é importante para programas de controlo, por serem o vector do parasita *Tripanosoma spp.*

Sendo as glossinas estritamente hematófagas, procuram o habitat mais favorável às suas preferências alimentares.

Onde há uma grande densidade de “caça grossa” e sendo a *G. m. morsitans*, considerada a mosca da “caça” e o facto do seu habitat preferencial ser as grandes savanas africanas, há uma correlação entre a presença de glossinas e o conjunto de condições ambientais propícios para a sua presença. Isto é, onde persiste uma quantidade de mamíferos, também persiste a presença de glossinas – **tanto mais numerosas são, quanto maior é a abundância de caça.**

Na savana africana, os locais mais frequentados pelos animais são também os mais infestados.

Durante a estação seca, em que tanto a água como os pastos só existem em determinados locais, a glossina concomitantemente com os animais ali reunidos pelas necessidades alimentares, encontram-se em muito maior abundância do que durante a estação pluviosa.



Fig. nº 5 - Versatilidade de mamíferos propícios para uma refeição sanguínea da *Glossina morsitans* (Parque Nacional da Gorongosa- Moçambique)

Apesar das glossinas terem uma grande capacidade de adaptação alimentar, têm preferência em grandes mamíferos por estes lhes fornecerem o repasto sanguíneo regular e necessário à sua sobrevivência, do que de pequenos mamíferos, que têm hábitos geralmente nocturnos e que por outro lado não lhes fornecem nem asseguram uma alimentação regular.

A título de curiosidade, sabe-se que apesar da zebra (*Equus burchelli*) habitar a savana africana, o sangue deste mamífero não é encontrado na *Glossina morsitans* (Weitz, 1963).

Devido a uma regressão na fauna de savana, verifica-se uma reorientação das preferências tróficas das glossinas para o gado e mesmo para o homem, por vezes os únicos hospedeiros disponíveis.

As influências climáticas, como referido, principalmente a temperatura e humidade, desempenham um papel importante na distribuição das glossinas, mas não são o factor de maior relevância da sua presença.

Estudos realizados em grandes e diferentes áreas geográficas com uma certa proximidade (Pereira Lapa 1917), demonstraram, que embora muito idênticas relativamente aos factores climáticos, podem apresentar diferenças em relação à presença de glossinas. Uma delas poderá encontrar-se infestadíssima e uma outra totalmente isenta de glossinas. Este factor deve-se às características do terreno. Numa, existe uma grande planície (savana) povoada de caça, e na outra, com terreno muito acidentado, a caça é rara e logo a incidência da glossina é muito inferior.

No mesmo estudo ficou provado que a glossina não escolhe para seu habitat as regiões montanhosas, também por serem áreas onde a caça escasseia, principalmente os animais de grande porte.

Ainda relacionado com as preferências da glossina, o estudo em regiões onde a sua presença era uma constante, concluiu-se que os pupários da tsétsé eram principalmente abundantes junto das veredas frequentadas pelos animais de grande porte.

1.4 -MORFOLOGIA, FISILOGIA E BIOLOGIA DAS GLOSSINAS.

1.4.1 - Morfologia Externa dos Adultos:

1.4.1.1 - Características gerais:

As glossinas, conhecidas por mosca Tsétsé, são dípteros ciclorrafos pertencentes à Família Glossinidae, que se caracteriza por apresentar apenas um género, o Género *Glossina*, que por sua vez é caracterizada por apresentar uma morfologia na cabeça (a lúmula e a sutura ptilineal), terem antenas curtas com três segmentos, sendo o terceiro provido de uma arista.

Os adultos apresentam uma morfologia externa idêntica a todos os outros Grupos do Género *Glossina*.

São moscas alongadas e maiores que a mosca comum, e o seu corpo é constituído por três partes principais: cabeça, tórax e abdómen.

Têm uma coloração castanha muito escura, podendo também apresentar uma coloração castanha mais clara.

Em repouso, as glossinas têm uma característica única devido ao facto de as asas cruzarem uma sobre a outra e sobre o abdómen, ultrapassando a extremidade posterior deste, coincidindo os dois ápices alares.

Apresentam um aspecto robusto, principalmente as de idade mais avançada, devido à forte quitina generalizada e à musculatura alar bem desenvolvida.

Após uma refeição sanguínea (RS) completa, que no caso da *Glossina morsitans* e segundo Machado 1958, tem a duração de escassos minutos (1 a 2), podendo sugar uma quantidade de sangue que pese mais do que ela própria, o abdómen apresenta-se bastante distendido, volumoso e de coloração vermelha.

O probóscis é longo, rectilíneo e, em repouso, projecta-se para diante da cabeça.
Os machos são mais pequenos que as fêmeas, mas perfeitamente distinguíveis através das genitálias.

Uma outra característica única das glossinas é a malha discal central das asas em forma de machado.



Fig.nºs. 6 e 7 – *Glossina morsitans morsitans* (colónia do IHMT - Fotos da autora)

A Cabeça:



Fig.nº8 - Cabeça da glossina
(www.answers.com)

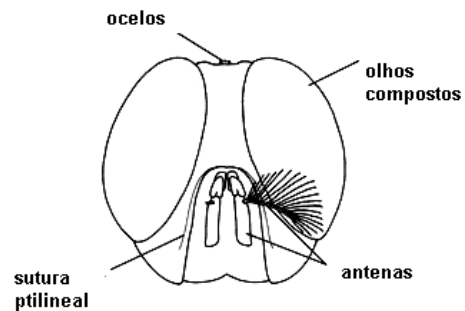


Fig. nº9 - Diagrama da cabeça
(FAO Corp. Doc. Repository)

Olhos compostos

Apresenta um par, de grandes dimensões, bem separado e de cor castanho-escuro. São compostos por milhares de pequenas unidades, chamadas no seu conjunto omatídeos. Permitem detectar objectos em movimento até 137 m e detectar simultaneamente pequenos e próximos movimentos.

Olhos simples ou ocelos

Possuem três ocelos, dispostos em triângulo no cimo da cabeça. Permitem detectar variações de luminosidade e potenciar estímulos recebidos pelos olhos compostos

Antenas – um par, situadas na região frontal da cabeça e inseridas em pequenas depressões entre os olhos compostos. Cada antena é constituída por três artículos, sendo o 3º alongado e apresentando uma arista plumosa.

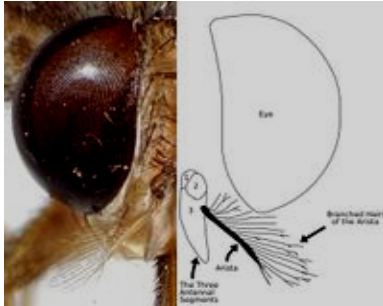


Fig. nº 10 - Arista da glossina
(www.answers.com)

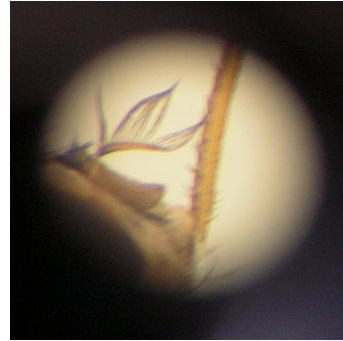


Fig nº 11 - Arista e probóscis
(Foto da autora)

Para além disso e ainda no 3º artículo, junto à ligação com o 2º artículo e na base da arista encontra-se um par de criptas olfactivas com numerosas sedas sensoriais que estão adaptadas para a capacidade táctil e olfactiva (mecanoreceptores, termoreceptores e químioreceptores).

A armadura bucal é formada por:

- **um par de palpos maxilares**
- **um probóscis.**

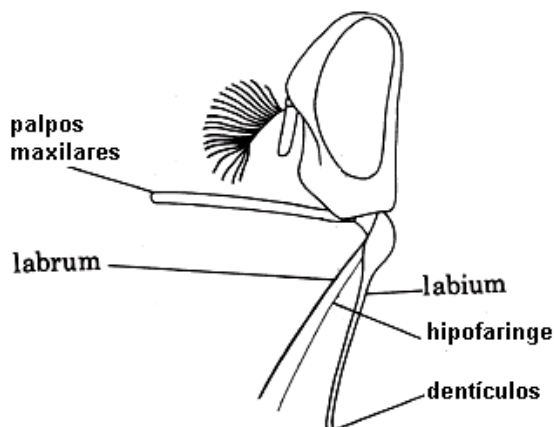


Fig. nº 12- Representação da armadura bucal
(FAO Corp. Doc. Repository)

O probóscis encontra-se na base da cabeça, formado e protegido externamente pelos palpos maxilares dispostos lateralmente.

O probóscis é longo, rectilíneo e projectado horizontalmente para a frente quando a glossina se encontra em repouso.

É constituído por:

- **lábio** (*labium*), com dentículos na sua extremidade;
- **lábrio epifaríngeo** (*labrum*);
- **hipogaringe.**

Estas três peças formam o canal alimentar, tanto nos machos como nas fêmeas.

O lábio é considerado o verdadeiro órgão picador e é formado por estruturas que no seu conjunto têm, como primeira função, dilacerar a pele do hospedeiro.

O labro apresenta também estruturas especializadas de modo a formar um canal – o canal alimentar, através do qual o sangue é aspirado durante a refeição sanguínea.

A hipofaringe é um longo tubo extremamente fino e a sua função é a de permitir a saída da saliva.

No momento da picada o probóscis baixa verticalmente e a glossina introdu-lo nos tecidos do hospedeiro, permanecendo os palpos maxilares no exterior e em posição horizontal. É nesta altura que se dá a laceração e, como consequência, o aparecimento de microhematomas dos vasos sanguíneos.

O processo da refeição sanguínea é um mecanismo muito diferenciado, pois é também acompanhado pela inoculação da saliva que tem propriedades vasodilatadoras e anticoagulantes, permitindo assim que os tripanossomas permaneçam por algum tempo no local de inoculação.

Tórax:

O tórax tem uma forma quadrangular, com uma sutura transversa que separa duas áreas bem quitinizadas:

- Pronoto;

- Mesonoto;

Esta sutura é designada por sutura Mesonotal.

Posteriormente, o tórax apresenta **o escutelo**, com sedas escutelares que podem ser de diferentes tamanhos. Lateralmente, está dividido em:

- Mesopleura;

- Pteuropleura, onde se podem observar dois pares de espiráculos que têm como função a respiração traqueal.

Acima do ponto de inserção das patas anteriores encontra-se o 1º par de espiráculos, estando o 2º par de espiráculos junto aos halteres ou balanceiros.

Os halteres ou balanceiros encontram-se por detrás da base das asas e são estruturas que auxiliam o insecto no equilíbrio e direcção do voo.

Ainda lateralmente pode-se observar longas e fortes sedas, que são importantes para a classificação taxonómicas das glossinas.

Asas:



Um par de asas que apresentam uma característica muito importante para a identificação do Género *Glossina*

Fig. nº13 - Representação de uma asa de glossina
(www.answers.com).

Apresentam uma célula central delimitada pela 4ª e 5ª nervuras em forma de machado.

Cada asa apresenta na sua base três estruturas:

- **álula;**
- **esquama alar;**
- **esquama torácica.**

Apresentam também uma nervura costal e uma nervura subcostal, bem como seis nervuras longitudinais.

Patas:

Como qualquer Díptero tem três pares de patas.

As suas características principais são o de serem finas e formadas por diversos segmentos:

- **coxa** que se encontra fixada ao tórax;
- **trocanter**;
- **fémur**;
- **tíbia**;
- **tarso, com 5 artículos.**

No último artículo encontram-se 2 garras e 2 polvilhos.

Os fémures, tíbias e tarsos apresentam sedas mecanoreceptoras e quimiorreceptoras. Os tarsos apresentam termorreceptores, que são estruturas que permitem testar a temperatura dos seus lugares de repouso (D'Amico *et al.*, 1992).

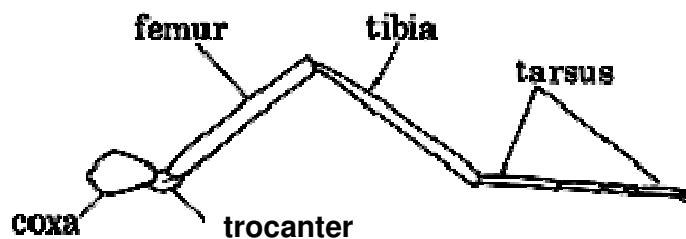


Fig. nº 14 - Pata de uma glossina. (FAO Corp. Doc. Repository)

Abdómen:

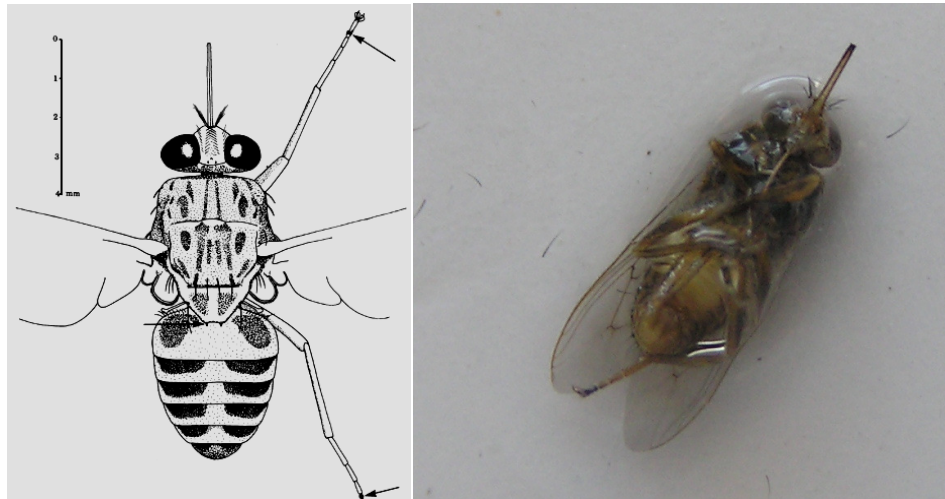


Fig nº15 - Representação do abdómen da *Glossina morsitans morsitans*
(FAO Corp. Doc. Repository) (Foto da autora- IHMT)

O abdómen da *Glossina morsitans* tem algumas características que a diferenciam das outras glossinas do mesmo Grupo. (Ex: *Glossina austeni*, *Glossina pallidipes*).

O abdómen é constituído por oito segmentos, sete dos quais podem ser visíveis dorsalmente:

- o primeiro segmento é coberto pelo escutelo
- o segundo segmento é muito mais largo que todos os outros.
- os três últimos segmentos têm uma morfologia modificada constituindo a genitália, feminina ou masculina.

Na face dorsal observam-se fortes placas, as tergites, uma por cada segmento, que podem apresentar uma coloração uniforme ou manchas escuras.

Estas manchas e a própria coloração é um meio auxiliador de identificação de algumas espécies.

A fase ventral apresenta uma cutícula elástica que permite ao abdómen distender-se quando as glossinas efectuem uma refeição sanguínea, ou nas fêmeas grávidas, criando condições de espaço para o desenvolvimento larvar.

Lateralmente e ao longo de todo o abdómen observam-se sete pares de espiráculos.

Os espiráculos são aberturas na parte lateral do corpo do insecto que se abrem para o exterior através de tubos finos.

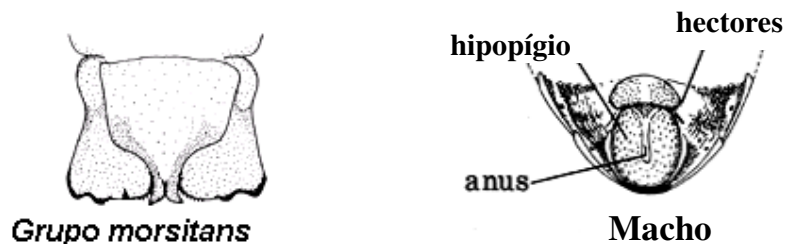
Os insectos podem fechar os espiráculos de forma a evitar a entrada de água, são também utilizados para obter oxigénio e eliminar o excesso de dióxido de carbono. Como as glossinas são vulneráveis à desidratação, fecham os espiráculos de forma a conservar água nos seus corpos.

Devido a este sistema de tubos no seu corpo, podem permanecer vivas durante muito tempo com os espiráculos fechados. Isto significa que os insectos levam bastante tempo a morrer num ambiente anóxico.

No entanto, em condições anóxicas, a glossina abre os espiráculos para tentar obter oxigénio e a morte é provavelmente causada pela perda de água, devido à desidratação.

Genitália:

Genitália masculina



**Fig. nº 16 - Características da genitália masculina do *Grupo morsitans*
(FAO Corp. Doc. Repository)**

A extremidade dos furcículos superiores é dilatada e geralmente estão em contacto.

Por observação lateral, pode-se verificar uma protuberância convexa na face ventral da extremidade posterior do abdómen.

Esta estrutura corresponde ao hipopígio, que apresenta a meio um sulco longitudinal, dilatado na extremidade, onde se encontra o ânus.

Anteriormente ao hipopígio há uma placa bilobada, contendo sedas escuras e posicionada ao nível do 5º segmento, como já foi referido são os hectores.

São estas estruturas que permitem afirmar que se trata de uma glossina macho e são também estas estruturas que permitem manter a fêmea presa durante a cópula.

Genitália feminina

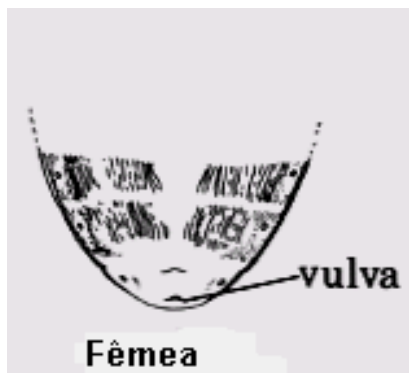


Fig. nº 17 - Esquema. da genitália feminina
(FAO Corp. Doc. Repository)

A genitália do Grupo *morsitans* apresenta as placas dorsais ausentes ou reduzida, assim como a placa mediana mal individualizada

O número, a disposição, a forma e a pilosidade das placas são utilizados para o estudo da sistemática.

1.4.2 - Anatomia Interna das Glossinas Adultas:

1.4.2.1 - Sistema Digestivo:

As glossinas, sendo um insecto hematófago, estão adaptadas para a ingestão de sangue, como já foi referido. A morfologia externa da armadura bucal está preparada para todo o processo, que se inicia, grosso modo, no probóscis que é considerado o órgão picador. O probóscis tem na sua constituição todas as estruturas para formar o canal alimentar.

Durante a aspiração do sangue são também intervenientes no processo, duas glândulas salivares para a formação e libertação da saliva.

Quando se inicia o processo para a refeição sanguínea e quando há a libertação da saliva, esta mistura-se com o sangue.

Características de alguns elementos do sistema digestivo:

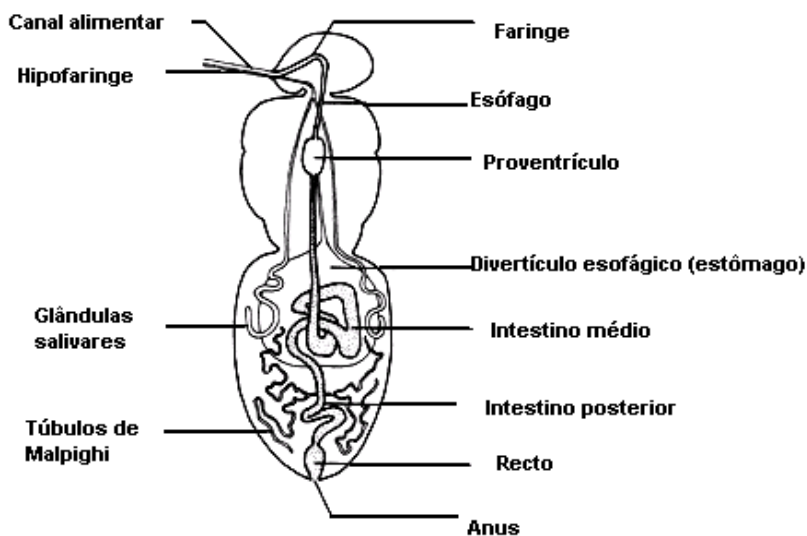


Fig. nº18 - Sistema digestivo da glossina
(FAO Corporate Document Repository)

Canal alimentar

O canal alimentar é formado por diversas estruturas, localizando-se no interior da hipofaringe, prolongando-se internamente na cabeça através da Faringe – que tem por função aspirar o sangue através do esófago, tubo de passagem do sangue para o ventrículo e penetra na cavidade torácica no proventrículo.

Proventrículo

É um pequeno mas importante órgão muscular por onde passa o sangue, primeiro para o divertículo esofágico (situado na porção anterior do abdómen), onde é armazenado provisoriamente, durante cerca de 30 minutos, sendo posteriormente enviado através do divertículo esofágico para o proventrículo, onde é imediatamente redireccionado para o intestino médio (FAO Corporate Document Repository)

Contudo, após as primeiras refeições sanguíneas, o divertículo pode apresentar sangue durante cerca de 12 h. (Afonso, 2000)

O proventrículo tem as seguintes funções:

- regularizar o fluxo do sangue ingerido no decorrer da refeição sanguínea;
- as células secretoras vão dar origem à membrana peritrófica.

Esta membrana tem funções muito importantes, para além de ser, nas glossinas, de formação contínua e eliminada regularmente. Tem funções muito importantes tais como:

- separar a refeição sanguínea do epitélio gástrico,
- intervir na digestão sanguínea,

- intervir no decorrer da infecção tripanossómica da tsétsé , nomeadamente, na instalação dos tripomastigotas intestinais (Afonso, 2000, Willet,1966 & Langley,1975b).

Divertículo esofágico

Órgão receptor do repasto sanguíneo, que se distende para receber o sangue, ocupando quase todo o abdómen, que aumenta igualmente de volume.

Intestino médio

É um longo tubo que está dividido em três segmentos (anterior, médio e posterior) e estende-se desde da face dorsal do proventrículo até à inserção dos tubos de Malpighi

É no intestino médio que o sangue se encontra envolvido por uma membrana - a **membrana peritrófica**.

Intestino posterior

Começa no local onde os tubos de Malpighi atingem o intestino até ao ânus e é nele que se misturam os alimentos não digeridos e o produto da excreção dos tubos de Malpighi.

1.4.2.1.1 - Picada, Ingestão de sangue, digestão e assimilação sanguínea:

As glossinas, como já referido, são moscas hematófagas e causam lesões nos capilares do hospedeiro quando fazem a sua refeição sanguínea.

Quando pica, o sangue não é sugado directamente dos capilares, mas de pequenas acumulações hemorrágicas que se formam na espessura da derme. Nessas acumulações, a glossina injecta uma certa quantidade de saliva através da hipofaringe.

O primeiro relato da actividade anticoagulante na mosca tsé-tsé foi feito em 1966 por Hawkins, que detectou um activador de plasminogénio na glândula salivar e uma actividade anticoagulante atribuída a um inibidor da trombina

Foram também encontradas duas fracções com inibidores da agregação plaquetária. Esta molécula, o TTI (Tsetse Thrombin Inhibitor), é um pequeno péptido com grande actividade inibitória sobre a trombina.

Estudos posteriores mostraram que o gene que codifica o TTI é expresso na glândula salivar e no intestino e a expressão é induzida pela alimentação.

Esse anticoagulante apresenta uma função dupla: evitar a coagulação sanguínea no local de lesão no hospedeiro, permitindo o sangue fluído para a realização da refeição sanguínea e no trato digestivo do parasita. (Song Li, Xiaqai Chen;1998).

Após a chegada do sangue ao estômago, aquele sofre alteração da cor, tornando-se escuro, sob a acção de enzimas responsáveis que são segregadas pelo segmento médio e por haver uma absorção de água e iões pelas células intestinais do segmento anterior, tornando o produto sanguíneo que se encontra no espaço endoperitrófico muito mais negro e pastoso.

No segmento posterior do intestino médio dá-se a absorção dos produtos resultantes da digestão: aminoácidos, açúcares e lípidos.

Os aminoácidos são muito importantes para a síntese das proteínas essenciais, tanto para as glossinas jovens como para as glossinas adultas e principalmente para as fêmeas na reprodução.

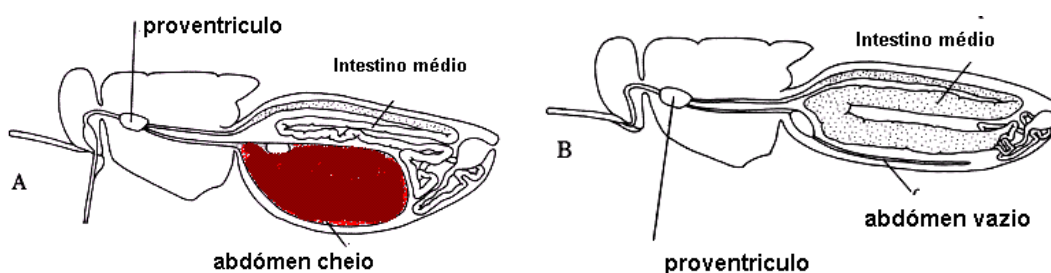


Fig. nº19 - Representação de duas glossinas **A** - glossina após refeição sanguínea,
B - glossina em jejum ou faminta
(Adaptado de FAO Corp. Doc. Repository)

Durante e após a ingestão, a água contida no sangue em excesso é excretada através dos tubos de Malpighi, que são constituídos por dois pares de longos tubos de coloração esbranquiçada ou amarelada. Os tubos de Malpighi são considerados um órgão excretor.

Também há uma certa perda de água pela via respiratória, mas esta está muito dependente das condições climáticas, como já foi referido.

Todo este mecanismo é regulado e efectuado através dos espiráculos.

1.4.2.2 - Ciclo Alimentar:

O conhecimento do estado de relativa fartura ou carência alimentar de uma dada população de glossinas interessa sob muitos aspectos, teóricos e práticos.

Pode fornecer-nos indicações acerca da influência das modificações climáticas, da vegetação ou das inundações, acerca do efeito de certas medidas de combate (quer elas incidam sobre os hospedeiros, quer sobre o *habitat* da mosca); pode dar-nos também a ideia da frequência com que as glossinas se alimentam (o que tem grande influência epidemiológica).

Para facilitar o estudo do ciclo alimentar das Glossinas distinguem-se 4 estados de nutrição, classificados de I a IV:

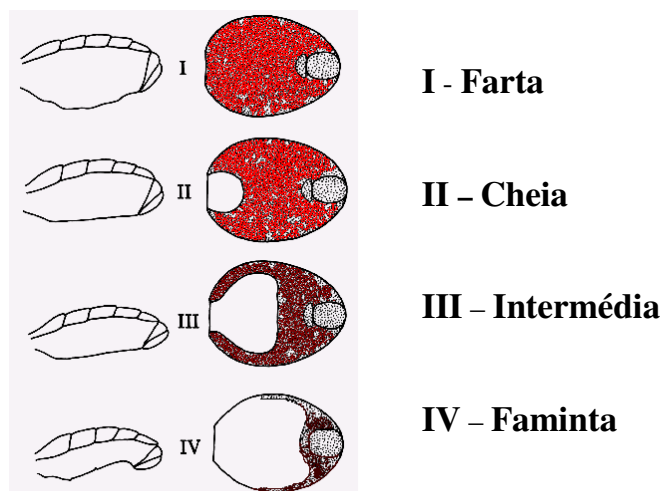


Fig. nº 20 - Aparência do abdômen nos diferentes estados de fome, na esquerda vista lateral, na direita vista abdominal (Adaptado de FAO Corp. Doc. Repository).

Segundo Jackson (1933) a caracterização destes estados é a seguinte:

a) uma glossina encontra-se no estado I ou II quando o seu abdómen não está enrugado, nem côncavo, do lado ventral; não tem cor de palha e é opaco, pelo menos em dois terços do comprimento, quando se examina contra a luz;

b) no estado IV o abdómen deve ser francamente côncavo ou achatado e amarelo quando observado à luz;

c) no estado III, ou seja o estado intermédio, quando o abdómen não corresponder às condições anteriores.

Para estudos de nutrição de uma colónia devem-se ter algumas considerações, para que, valores que possam inflacionar os resultados, não sejam considerados, como por exemplo as glossinas em estado de gravidez.

Eliminam-se também das determinações as moscas jovens que não tenham feito a sua primeira refeição, as chamadas “mosca em jejum” (mosca teneral), o que tem um significado não só fisiológico mas também cronológico e que convém não confundir com “moscas esfomeadas” (estado IV).

Devido a estes factores deve-se apenas fazer os estudos com adultos machos.

O “estado alimentar médio” (means hunger stage, M.H.S.) determina-se multiplicando por 2 o número de moscas no estado II, por 3 o de moscas no estado III, por 4 o de moscas no estado IV e a soma destes produtos é dividida pelo total das moscas dos respectivos estados.

Determinações deste tipo têm sido feitas sobretudo no Grupo *morsitans*, (Jackson, 1937).

Do grupo das *Glossinas morsitans*, as moscas esfomeadas ao pousarem sobre um ser humano, colocam-se de cabeça para cima, ao passo que as que se encontram cheias ficam de cabeça para baixo (FAO Corp. Doc. Repository).

O ciclo alimentar do Grupo das *morsitans* é cerca de 4 dias, alongando-se na estação fria para 8-10 dias, tendo a duração do ciclo alimentar variações estacionais, que estão relacionadas possivelmente com a temperatura e com a humidade.

	Teneral	Não Teneral
Refeição Sanguínea	Quando observada à luz não se vê área escura no abdómen.	Vê-se área escura no abdómen, indicando última RS.
Côr	Branco - acinzentado na parte inferior do abdómen.	Branco – creme pálido na parte inferior do abdómen.
Tórax	Tórax mole, quando apertado suavemente, entre os dedos.	Tórax mais firme, quando apertado suavemente, entre os dedos.
Ptilinium	Quando se aperta os lados da cabeça, o <i>ptilinium</i> é facilmente empurrado para fora.	Quando se aperta os lados da cabeça, o <i>ptilinium</i> não é facilmente empurrado para fora.

Tabela nº 1 - Diferentes características para o reconhecimento da mosca teneral e não teneral

1.4.2.3 - Sistema circulatório:

Os produtos resultantes da digestão e que são absorvidos, chegam aos restantes órgãos e tecidos através do sistema circulatório, através de um simples tubo com funções cardíacas a que se dá o nome de aorta, localizada ao longo do lado dorsal do corpo.

O sistema circulatório da glossina é constituído por um líquido a hemolinfa (“sangue”), muito rico em aminoácidos, assim como de células que fazem parte do sistema imunitário do insecto. **Não transporta oxigénio.**

Do mesmo modo são expelidos, através dos tubos de Malpighi, os produtos finais do metabolismo.

1.4.2.4 - Sistema neuro-endócrino:

Todas as capacidades sensitivas e comportamentais, assim como os estímulos visuais, olfactivos, térmicos e outros das tsétsé, são controlados pelo sistema nervoso.

1.4.2.5 - Aparelho reprodutor:

Glossina macho:

O aparelho reprodutor é constituído por:

- **Um par de testículos** que são longos tubos enrolados em espiral, envolvidos por uma membrana acastanhada e preenchidos com espermatozóides.

- **Canais deferentes** que partem dos testículos e ligam-se a duas glândulas anexas, cuja secreção dilui o líquido seminal e intervêm na formação dos espermatozóides.

- **Canal deferente comum** que é um canal que parte da junção dos canais deferentes e das glândulas anexas, contorna o recto e penetra no aparelho fálico (Afonso, 2000).

Glossina fêmea:

As glossinas são larvíparas sendo o seu aparelho reprodutor constituído por:

- **Dois ovários** com grandes dimensões, assimétricos e do tipo politrófico, tendo cada um deles dois ovaríolos, um interno e outro externo.

- **Dois oviductos;**

- **Duas espermatecas** esféricas, com cor castanha e muito quitinizadas.

O espermatozóide de um macho é armazenado nos receptáculos da fêmea. Ela pode ser inseminada mais do que uma vez e por diferentes machos. No entanto estudos realizados demonstraram que a maioria das fertilizações (75%) são originárias da primeira inseminação (Langley, 1977., Afonso, 2000).

- **Uma glândula uterina** constituída por tubos ramificados que permite a alimentação intra-uterina da larva;

- **Útero** é uma estrutura muscular e muito extensível e fica situado na região postero-ventral do abdómen. Termina no exterior, pela vagina, abaixo das placas genitais.

1.5 - Relação Endossimbionte com a Glossina:

É também interessante referir, e como curiosidade, que a glossina, para além de possuir um mecanismo de hemostase, tem uma relação endossimbionte com algumas bactérias intracelulares. A glossina, tem uma dieta restrita, constituída exclusivamente de sangue de mamíferos e como consequência, carece de outros componentes metabólicos, muito necessários para a sua sobrevivência e longevidade assim como para a fertilidade das glossinas fêmeas.

Há algumas bactérias endossimbiontes com presumíveis e diferentes funções nas glossinas:

A - *Wigglesworthia glossinidia* uma bactéria endossimbionte, intracelular, do estômago anterior da glossina. A principal função é a de codificar as vias da biosíntese das vitaminas, que suplementam a dieta restrita da glossina. Esta hipótese é também sustentada, pelo facto, de que, as glossinas ficam estéreis na ausência da *Wigglesworthia glossinidia*. (MacFaddin, 1980).



**Fig. nº 21 - Estômago de uma glossina
com *Wigglesworthia glossinidia*
(Foto de S. Aksoy)**

B – *Soldalis glossinidius*. É também uma bactéria endossimbionte, encontrada exclusivamente na glossina, é inter e intracelular em vários tecidos do hospedeiro, incluindo o intestino médio e hemolinfa. O papel simbiótico, desta bactéria, ainda está pouco esclarecido. No entanto, provou-se ser difícil eliminá-la selectivamente sem induzir a esterilidade no hospedeiro (Darby, 2005).

1.6 - O Ciclo de Vida:

O conhecimento do ciclo de vida das glossinas resulta, de numerosos estudos efectuados em colónias mantidas em laboratório e também estudos realizados no terreno por diversos investigadores.

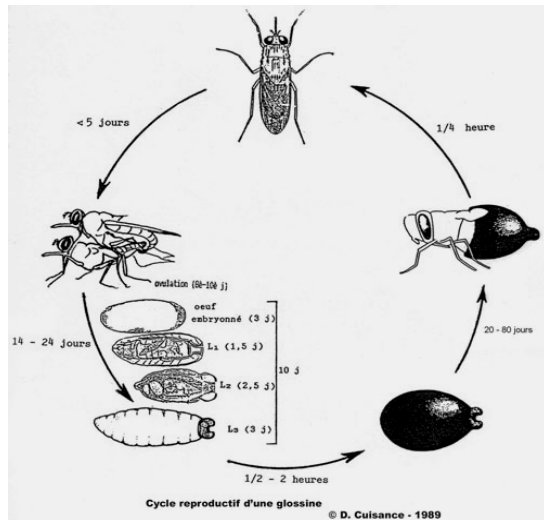


Fig. nº 22 - Ciclo de vida da *Glossina spp*
(FAO Corp. Doc. Repository).



Fig.nº 23 - Pupas e glossinas tenerais
(Foto da autora).

A grande maioria das fêmeas é fecundada antes de efectuar a primeira refeição sanguínea, ou pouco tempo depois mas, só no 3º dia de vida no estado de imago atingem a capacidade máxima de acasalamento e de fertilização.

A cópula dura geralmente pouco mais de uma hora (Jordan, 1958).

Durante o coito, o edeago penetra na vagina e a sua porção terminal adapta-se à abertura do canal das espermatecas, depositando o espermatóforo (massa gelatinosa contendo espermatozóides).

O ovo é fertilizado no útero e três dias depois, dá-se início ao primeiro estadio larvar (L1), que atinge cerca de 1,8 mm de comprimento e permanece nesse estadio cerca de dois dias.

Ao libertar-se do seu revestimento, dá origem à larva do segundo estadio (L2), que atinge cerca de 4,5 mm de comprimento, mantendo-se neste estadio cerca de três dias.

Findo este tempo, passa a um outro estadio (L3) que sofre um rápido desenvolvimento e crescimento. A extremidade posterior da larva apresenta os lobos polipneusticos que permitem a respiração larvar.

O líquido nutritivo, vindo da glândula uterina, é ingerido pela larva durante todos os estadios.

Um dos factores mais importantes da reprodução das glossinas é o de serem vivíparas. As glossinas põem durante toda a vida uma larva mais ou menos de 10 em 10 dias e cada fêmea é capaz de originar, ao longo de toda sua vida, em média, umas 8 a 10 larvas.

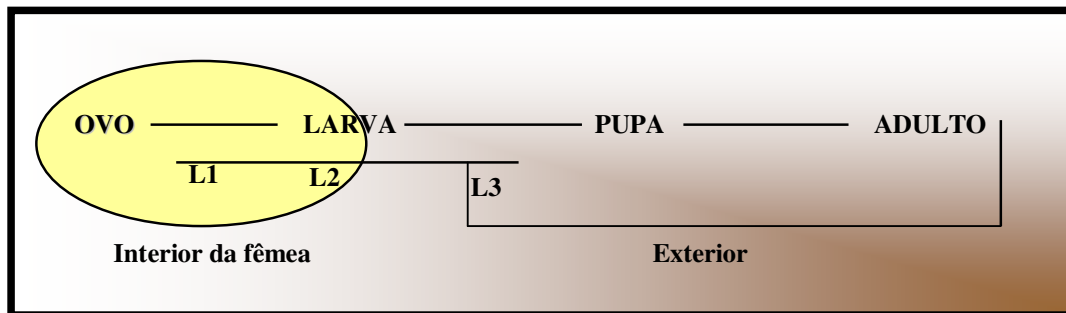


Fig. nº 24 - Representação do ciclo de vida da glossina
(Disciplina de Entomologia Prof. Doutor A. Santos Grácio)

A larviposição ou “postura”, é normalmente diurna e em locais favoráveis à larva. Pode realizar-se junto aos locais habituais de repouso dos adultos, em solo não compacto, arenoso, sob troncos e ramos caídos, em buracos existentes no solo, mas sempre à sombra.

Já no solo, a L3 apresenta o corpo mole em forma de barril, de cor esbranquiçada, dividida em 13 segmentos, que são difíceis de observar na totalidade, sendo cada um, com excepção do último, cobertos por minúsculas papilas.

O 12º segmento é modificado e contém na sua extremidade posterior duas saliências arredondadas e rugosas, **os lobos polipneusticos**, onde vão dar os canais respiratórios da larva, que deixam de ser funcionais durante a vida pupal e **cuja morfologia é característica da espécie.**

O segmento cefálico da larva contém um par muito pequeno de apêndices formado pela fusão das antenas e dos palpos maxilares.

Esta larva apresenta movimentos de reptação e tem um curto período de vida livre à superfície do solo de apenas alguns minutos (15 a 20)

A L3 penetra rapidamente no solo, graças aos seus movimentos peristálticos, permanecendo a uma profundidade geralmente muito pequena.

Quando se imobiliza, o tegumento escurece, a cor de branca, passa a amarela, depois a laranja e finalmente a castanha. Endurece e apresenta uma cor opaca, castanha muito escura ou preta, formando assim o pupário, revestimento exterior da pupa

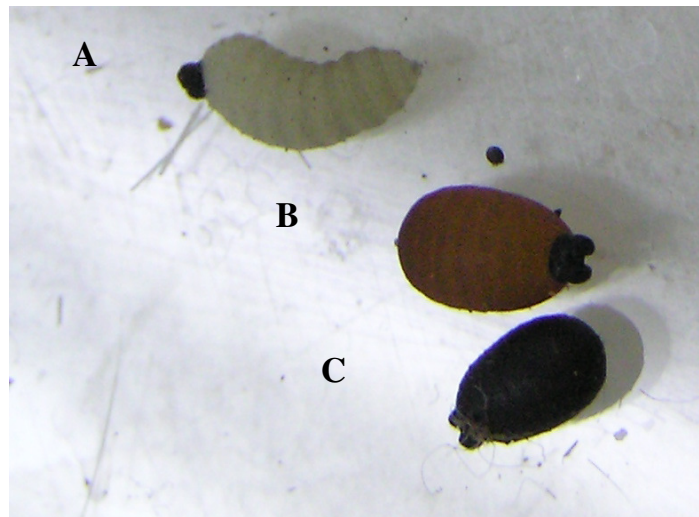


Fig.nº 25 – A - Larva; B - Início da formação da pupa (sem movimentos); C - Pupa
(Foto da autora)

A pupa é formada por duas partes:

- **uma**, externa, o **pupário**;
- **uma**, interna, **a pupa propriamente dita.**

Apresenta o tegumento muito escuro até ao preto e quitiniza, tornando os movimentos impossíveis. Tem a forma de um pequeno barril segmentado, de uns 5-6 mm de comprimento (Fig nº25).

No interior do pupário dão-se metamorfoses, que irão originar o insecto adulto:

- nos dois primeiros dias, a L3 passa a L4 ou pré –pupa;
- a separação da nova epiderme pupal da velha cutícula larvar marca o início do estadio pupal criptocefálico (três dias);
- a evaginação da cabeça e dos apêndices torácicos, a organização interna dos tecidos e dos órgãos e a disposição traqueal marcam o início do estadio pupal fanerocefálico (três dias);
- o verdadeiro estadio pupal termina quando se dá a separação da epiderme do novo adulto da cutícula pupal e é nesta fase e até à eclosão que a glossina é considerada um adulto na fase de pré eclosão.

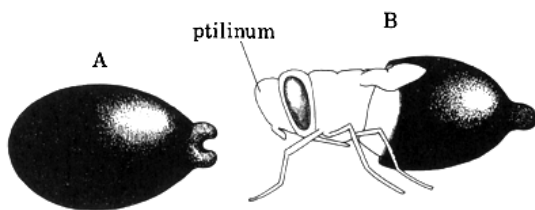


Fig. nº 26 – A - Pupa; B - pré-eclosão da glossina
(FAO Corp. Doc. Repository)·



Fig. nº 27 – Pré-eclosão de uma glossina
(Foto da autora) -IHMT

A duração da fase pupal varia em função de diversos factores. A uma temperatura de 24-25° C será de cerca de 30 dias. No entanto pode variar, consoante as estações do ano.

A pupação necessita também de uma ligeira humidade no solo, mas as inundações são fatais, assim como temperaturas muito elevadas ou muito baixas, as desflorestações, as queimadas, os predadores e os parasitas.

A permeabilidade do tegumento pupal varia com as espécies. A *Glossina morsitans* de habitat xerofítico tem uma menor permeabilidade do que as glossinas de habitat higrofítico.

O pico da eclosão dos adultos verifica-se a meio da tarde (*G. morsitans*), condicionado principalmente pela temperatura, não se efectuando a temperaturas inferiores a 18°C ou superiores a 32°C.

A eclosão do adulto dá-se pela ruptura da casca da pupa, causada pela pressão de um saco eversível, o *ptilinium*, situado entre os olhos, que após a eclosão é recolhido.

As humidades relativas baixas impedem a eclosão, talvez por desidratarem a pupa.

A fecundidade depende em grande parte da alimentação e o ritmo das posturas depende também da temperatura ambiente.

1.6.1 - Criadouros:

O conhecimento da ecologia do estado pupal e das condições a que obedecem os criadouros naturais, assim como a localização destes, tem evidentemente uma grande importância.

Uma das formas possíveis de combate à glossina é o combate às pupas, quer directa, por apanha ou outro método, quer indirecta, pela modificação do clima ou do solo dos criadouros.

Na natureza e em determinadas regiões que não apresentem lugares propícios para a postura das larvas, visto ser um factor importante, não será viável a permanência de glossinas.

Exemplo de um requisito para um criadouro da *Glossina morsitans* é a natureza do solo, que tem que ser seco e solto, arenoso ou formado por detritos móveis mais ou menos grosseiros, sem precisar de ser muito profundo, pois geralmente a pupa não está a mais de 1-2 cm de profundidade.

Um outro factor é que os criadouros devem estar sempre em locais ensombrados e abrigados da chuva.

1.6.2 - Fase de Adulto:

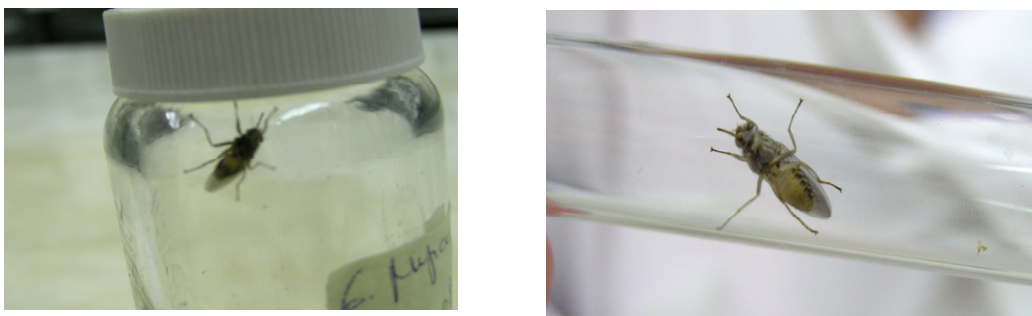


Fig. nº 28 e Fig. 29 - Glossina adulta (IHMT)
(Fotos da autora).

Uma vez saída da casca pupal, a glossina recolhe o *ptilinium*, estende as patas e as asas antes que o tegumento seque e fica então no estado chamado de “jejum”, ou seja é uma glossina teneral, em que abdómen está vazio e se mostra leitoso à transparência.

O tegumento é mole e o *ptilinium* sai com facilidade quando se comprime ligeiramente a cabeça entre os dedos.

Na colónia existente em laboratório esta fase (a mais bem definida de todas), e por ser uma metodologia aplicada, a glossina teneral fica cerca de 12-24 horas, sem a primeira refeição sanguínea.

Na natureza no entanto, não se sabe qual o tempo em que a glossina teneral leva a procurar a sua primeira refeição.

Desta fase em diante é muito difícil distinguir a idade das glossina adultas.

Para estudos das populações por idades, têm-se estabelecido escalas de idade das Tsétses, sendo a mais usada a de Jackson (1946), que distingue 6 idades, caracterizadas pelo grau de desgaste do bordo das asas.

1.6.3 - Duração da vida:

A duração de vida das glossinas é de interesse relativo, uma vez que, tanto o habitat, clima e outras dificuldades inerentes ao trabalho de campo, só nos permite ter uma ideia aproximada desse factor e nunca uma quantificação exacta.

Alguns dados obtidos através da manutenção de glossinas em ambiente laboratorial são inevitavelmente inexactos, quanto à duração da vida das glossinas, pelo artificialismo, em parte favorável, em parte desfavorável.

No entanto, estudos de Vanderplank (fide Buxton, 1955), Geigy (1948), e Nash & Page (1953), verificaram que as fêmeas têm um tempo de vida superior ao dos machos

1.6.4 - Proporção sexual:

A proporção sexual, *sex-ratio*, ou relação entre o número de machos e o de fêmeas, é sensível a diversas acções: climáticas e biológicas.

Este dado é importante, para estudos epidemiológicos nas populações naturais, assim como, para estudos do modo como uma população de glossinas pode ser modificada.

Em estudos realizados em laboratório, verificou-se que, à nascença, o *sex-ratio*, tem aproximadamente uma proporção de 1/1 (Barros Machado, 1958).

Na colónia do IHMT em Lisboa verificou-se que o número de glossinas que eclodem têm também uma proporção idêntica, embora por vezes se tenha verificado um maior número de glossinas fêmeas eclodidas num dia.

No entanto, o número de glossinas fêmeas na colónia é muito superior ao dos machos, sendo este dado também verificado na natureza (Machado, A. Barros 1958).

A explicação deste factor, segundo vários estudos referidos, é de que as glossinas fêmeas duram francamente mais tempo do que os machos.

Na natureza, a estação do ano e o tipo de vegetação, por exemplo, são factores de variações do *sex-ratio*. Sabe-se também que os machos são mais afectados pelas temperaturas elevadas do que as fêmeas.

1.6.5 - Causas de morte:

As razões de maior susceptibilidade de causar a morte mais ou menos rápida das glossinas na natureza são:

- as condições climáticas desfavoráveis em determinados períodos do ano;
- a falta de alimento suficiente;
- as queimadas;
- as inundações (que afectam a pupa);
- os predadores e
- os parasitas.

Os predadores são muito variados e vão desde o homem às formigas, passando pelas aves, batráquios, aranhas etc.

Os parasitas, são numerosos, afectando uns, as glossinas no estado adulto, outros, a pupa e a larva. Os mais frequentes são: Nemátodes, Himenópteros, Dípteros, Fungos, Hemogregarinas, Bactérias, etc.

1.7 - INTERESSE EM MEDICINA.

1.7.1- Doença do sono ou Tripanossomíase Africana:

O interesse em medicina de estudos sobre a *Glossina spp*, e em especial a *Glossina morsitans morsitans* é por serem o vector de uma das doenças tropicais endémicas mais complexas, provocadas por um parasita unicelular que transmite ao Homem uma doença grave a “doença do sono” ou Tripanossomíase Humana Africana (THA), ou “Nagana”, em animais.

Esta doença afecta uma quantidade estimada de 60 milhões de pessoas em 35 países africanos (OMS, 2005).

A THA é uma doença frequentemente fatal, causada pelo parasita unicelular *Trypanosoma brucei*.

Há dois tipos de parasita que afectam o ser humano: o *Trypanosoma brucei gambiense*, comum na África Ocidental e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, na África Oriental.

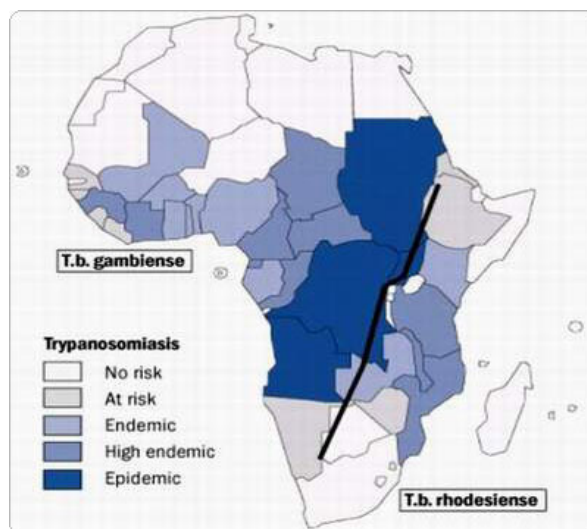


Fig. nº 30 – Mapa da representação geográfica da presença do *Trypanosoma brucei*
(www.medicalecology.org).

1.7.2 - Sistemática do *Trypanosoma brucei*:

Sistemática

Reino:	Protista
Filo:	Euglenozoa
Classe:	Kinetoplastea
Ordem:	Trypanosomatida
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Espécie:	<i>T. brucei</i>

Subespécie: *T. brucei brucei*
T. brucei rhodesiense
T. brucei gambiense



Fig. nº 31 - *Trypanosoma brucei*

(www.dpd.cdc.gov)

1.7.3- Características do *Trypanosoma brucei*:

O *Trypanosoma brucei* apresenta as seguintes formas:

- Epimastigota – o corpo basal encontra-se na posição anterior ao núcleo com um flagelo largo ligado ao longo do corpo celular.
- Tripomastigota – o corpo basal é posterior ao núcleo, com um flagelo largo ligado ao longo do corpo celular.

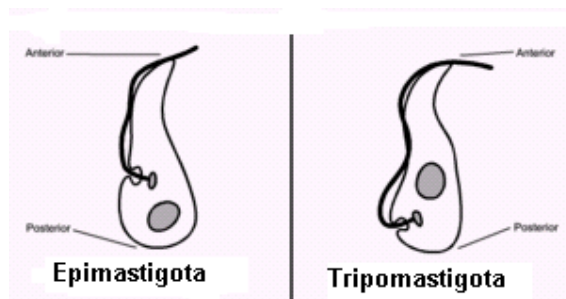


Fig. nº 32 - Representação de formas do Tripanossoma
(FAO Corp. Doc. Repository).

O *T. brucei* encontra-se, no hospedeiro normalmente, na forma Tripomastigota e diferencia-se em Epimastigota proliferativa nas glândulas salivares da glossina.

O tripomastigota, a forma activa no sangue do hospedeiro, tem núcleo central, uma única e grande mitocôndria alongada que contem o cinetoplasto, zona com ADN mitocondrial. Tem um flagelo que lhe dá mobilidade e a sua membrana celular ondulante é recoberta por glicoproteínas muito imunogénicas, permitindo assim evitar a resposta imune do hospedeiro.

As formas epimastigota e promastigota, são as formas encontradas na mosca Tsétsé quando infectada, são menores e mais largas; contêm glicossoma, grânulos ricos em glicogénio.

1.7.4 - Variação Antigénica das Glicoproteínas “Variant Surface Glycoprotein” (VSG):

A superfície da célula do tripanossoma tem como componente, um revestimento uniforme de glicoproteínas variantes, o que lhe confere uma Variação Antigénica “Variant Surface Glycoprotein” (VSG). Este revestimento tem duas funções:

1- Como barreira física que bloqueia o reconhecimento da célula pelo Sistema Imunitário específico do hospedeiro, ocultando as proteínas invariáveis da superfície, como por exemplo: canais iónicos, receptores, etc., ao reconhecimento do sistema imunológico

2- Como uma superfície variável para a célula, o que lhe permite a variação e adaptação específica para evitar o sistema imunológico.

Acredita-se que este revestimento, altamente variável, é codificado por várias centenas de cópias alternativas de um gene do genoma.

É pois um mecanismo altamente eficiente para iludir o sistema imunológico, uma vez que o parasita substitui o seu revestimento com uma outra variação de glicoproteínas.

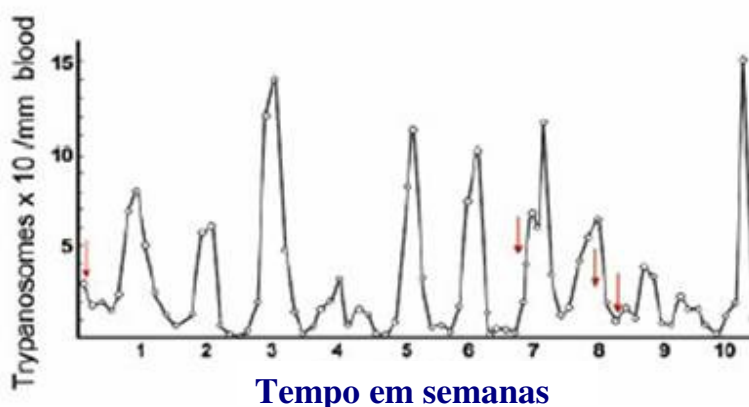


Fig. nº 33 – Esquema gráfico do efeito da VSG numa infecção por tripanossoma

Após a infecção, o tripanossoma expressa uma determinada VSG. Nessa altura o sistema imunitário do hospedeiro gera uma resposta concreta a essa superfície de proteínas. Nesta fase da infecção haverá uma diminuição da população de tripanossomas. É nesta altura que uma célula que expresse uma VSG alternativa será fortemente seleccionada, ressurgindo a infecção.

O efeito geral deste ciclo de proliferação e recidiva da população, devido ao ciclo da relação predador/presa com o sistema imunitário do hospedeiro, dá lugar a uma sucessão de episódios de infecção, cada uma devido a uma população com diferentes expressões da superfície VSG.

1.7.5 - Ciclo de Vida do *Tripanossoma spp*:

Os tripanossomas são parasitas que apresentam um ciclo de vida monoxênico.

O parasita existe na saliva das moscas Tsétsé e é injectado durante a sua refeição sanguínea.

A forma tripomastigota, multiplica-se e invade todos os fluídos corporais, incluindo sangue e fluído extracelular nos tecidos.

Uma glossina é infectada quando se alimenta de um indivíduo doente (infectado).

Ao longo de um determinado tempo, cerca de um mês, o parasita assume várias formas (principalmente epimastigota), enquanto se multiplica no corpo da mosca, invadindo finalmente as suas glândulas salivares.

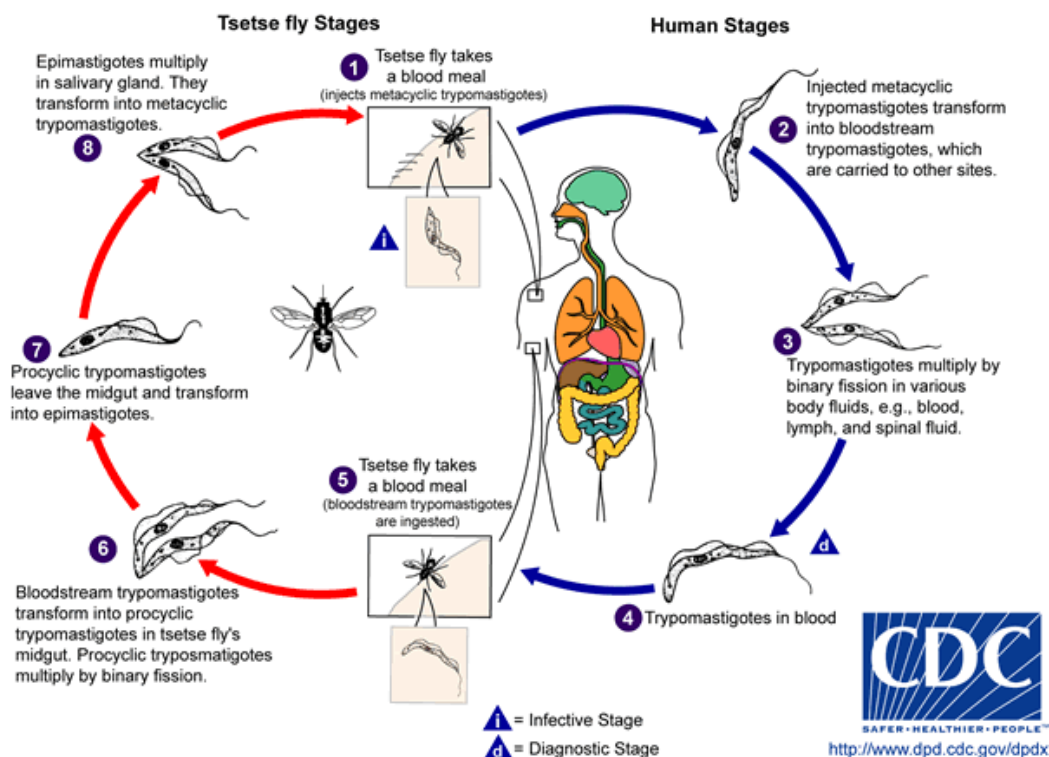


Fig. nº 34 – Ciclo de vida do *Tripanossoma spp*

Etapas no hospedeiro:

❶ Durante a refeição sanguínea no hospedeiro mamífero, uma glossina infectada injecta o parasita em forma de tripomastigota metacíclicos no fluxo sanguíneo.

O parasita entra no sistema linfático e passa para a circulação sanguínea

❷ Dentro do hospedeiro, transformam-se em tripomastigotas sanguíneos

❸ Estes, atingem todos os outros fluidos do sangue (linfa, líquido cefaloraquidiano (LCR), multiplicando-se por fusão binária

Etapas nas glossinas:

❹ ❺ O ciclo de vida completo do tripanossoma africano é representado pelas fases extracelulares.

A mosca tsétsé, anteriormente infectada devido à presença no sangue do hospedeiro, (quando se alimenta), de tripomastigotas, passam para o sistema digestivo da mosca, transformando-se em tripomastigotas procíclicos e multiplicando-se por fusão binária

❻ Deixam o estômago da mosca e transformam-se em epimastigotas

❼ Os epimastigotas multiplicam-se nas glândulas salivares e por contínuas multiplicações, transformam-se em tripomastigotas.

❽ O ciclo do parasita na mosca tem aproximadamente a duração de três semanas.

Os humanos são o principal reservatório do *Trypanosoma brucei gambiense*, mas esta espécie pode também ser encontrada em animais.

Animais selvagens são o principal reservatório do *Trypanosoma brucei. rhodesiense*, que pode também ser transmitido ao homem em determinadas circunstâncias.

1.7.6 - O Contacto Glossina – Homem:

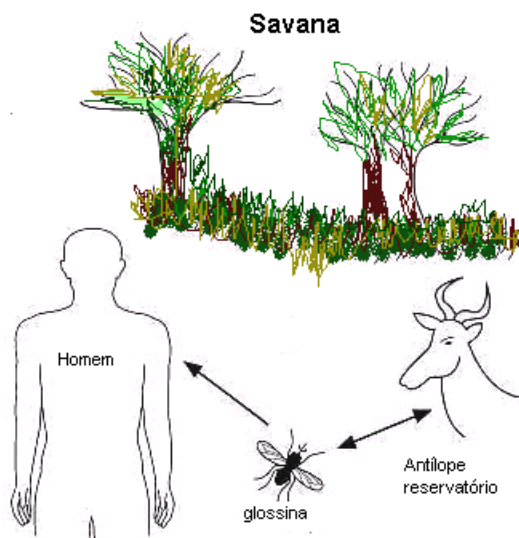


Fig..nº35 - Na África Oriental, as glossinas do Grupo *morsitans* são o vector do parasita *T. b. rhodesian* para o homem e animais.

(adaptado de FAO Corp. Doc. Repository)

Em zonas húmidas e sub-húmidas do Este Africano, os parasitas tripanossomas, que provocam a doença tanto nos humanos, como nos animais estão estritamente associados às glossinas.

Estas, são vectores destes parasitas, mas no entanto é necessário terem competência vectorial, isto é, têm que ter a capacidade de se infectarem, permitir a maturação dos tripanossomas e de os transmitir a outros mamíferos.

A *Glossina morsitans morsitans*, vector do parasita da THA tem como habitat principal a savana africana e florestas de “miombo”, zonas onde a população é escassa ou mesmo inexistente. Por estas razões a doença é raramente transmitida ao homem, mas no entanto por vezes este é contaminado quando associado a determinadas profissões (caçador, agricultor). Há um contacto com o homem quando este entra nas zonas onde a glossina habita.

Quer em situações enzoóticas, quer em situações epizoóticas, seria importante conhecer na circulação da glossina a localização do parasita, pois tal permitiria conhecer a infectividade de uma glossina.

No entanto, para que um estudo desta natureza fosse possível, seria necessário proceder-se a estudos no terreno, efectuar a dissecção das glossinas (tubo digestivo, glândulas salivares e probóscis), com a finalidade de encontrar e caracterizar o tripanossoma, uma vez que é, como se sabe, a saliva das glossinas a portadora dos tripanossomas metacíclicos infectantes, o que lhes confere a sua característica vectorial.

Para um estudo epidemiológico da doença do sono existem muitos aspectos importantes, mas é evidente que para um estudo da propagação da doença é muito importante o grau de contacto entre a glossina e o Homem, no seu *habitat* natural.

1.7.7 – Epidemiologia:

A doença do sono ou tripanossomíase humana ou animal ocorre apenas em África, nas zonas onde existe o vector, a mosca Tsétsé.

A Subespécie *gambiense* existe a Oeste do vale do grande Rift africano, nas florestas tropicais, em países como o Gongo, Camarões e Norte de Angola.

A transmissão é principalmente de humano para humano, com menor importância dos reservatórios animais. A doença assume a forma crónica. Para o *T b gambiense* o vector é a *Glossina palpalis*.

A Subespécie *rhodesiense* existe a leste do grande Rift, principalmente na região dos grandes lagos, nas savanas, em países como a Tanzânia, Quénia, Uganda e Moçambique. A patologia provocada por este parasita assume a forma aguda, a mais grave da doença.

Os antílopes, gazelas e animais domésticos são reservatórios importantes do parasita. O seu vector é a *Glossina morsitans*.

Quanto ao *T. brucei brucei* não causa doença em seres humanos, mas causa a doença Nagana nos animais.

Tabela representativa de THA e Nagana, sua distribuição geográfica e os diferentes vectores

Doença	Espécie afectada	Agente	Distribuição	Vector
THA forma crónica	Homem	<i>T. b. gambiense</i>	África Ocidental	<i>G palpalis</i> <i>G tachinoides</i> <i>G fuscipes</i> <i>G morsitans</i>
THA forma aguda	Homem	<i>T. b. rhodesiense</i>	África Oriental	<i>G morsitans</i> <i>G swynnertoni</i> <i>G pallidipes</i> <i>G fuscipes</i>
Nagana forma aguda	Antílopes Gado Camelos Cavalo	<i>T. brucei brucei</i>	África	<i>G morsitans</i> <i>G s. swynnertoni</i> <i>G pallidipes</i> <i>G palpalis</i> <i>G tachinoides</i> <i>G fuscipes</i>

Tabela nº 2 – Adaptação de FAO Corp. Doc. Repository

Observando o quadro acima, conclui-se que a primeira responsável da Tripanossomíase Humana Africana (THA) em forma aguda e Nagana ou Tripanossomíase Animal em forma aguda é a *Glossina morsitans*

1.7.8 - Patologia da doença – causas, incidências e factores de risco:

1.7.8.1-Progressão e sintomas:

Após a picada e inoculação de tripanossomas no hospedeiro, estes multiplicam-se localmente durante cerca de 3 dias, desenvolvendo por vezes um inchaço edematoso, denominado de “cancro tripanossómico”, que desaparece após três semanas. O inchaço não surge na grande maioria dos casos por infecção pelo *T. b. gambiense*.

Nas infecções com *T. b. rodesiense*, aparece um inchaço em cerca de 50% dos casos.

Os tripanossomas são encontrados em número significativo na circulação sanguínea do hospedeiro, disseminando-se e evadindo os linfonodos, invadindo o sistema nervoso central, onde causam os sintomas típicos da doença do sono.



Fig.nº 36 - “A doença do sono”- THA - (CDC 1996).

Os sintomas são todos durante as fases de replicação ou parasitémia. Os parasitas multiplicam-se no sangue, a maioria com uma mesma glicoproteína de membrana. No entanto alguns parasitas trocam a glicoproteína por outra do seu leque de 1000 genes.

Quando o sistema imunitário produz anticorpos específicos contra a glicoproteína dominante, a maioria dos parasitas é destruída. No entanto parasitas com capacidade de alterar as glicoproteínas, não são afectados pelos anticorpos devido ao fenómeno tão eficaz da VSG, como foi já referido.

Os sintomas, nesta altura da doença, tendem a cessar, mas os parasitas que não foram reconhecidos pelo sistema imunitário do hospedeiro não são afectados pelos anticorpos produzidos, multiplicam-se, gerando nova onda parasitêmica e novas manifestações dos sintomas.

O resultado parasitário aumenta e os sintomas agudos vão aumentando até originarem sintomas do tipo crónico. A grande quantidade de anticorpos, produzidos nesta fase, leva à formação de complexos dessas proteínas, que activam o Sistema Complemento e causam também directamente danos no endotélio dos vasos sanguíneos e nos rins. Os danos nos vasos sanguíneos formam edemas e microenfartes no cérebro, enquanto a anemia é provocada pela destruição dos eritrócitos

Os sintomas iniciais e recorrentes são a febre, tremores, dores musculares e articulares, linfadenopatia (gânglios linfáticos aumentados), mal-estar, perda de peso, anemia e trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue).

Na infecção por *T.b.rhodesiense* um dos órgãos que podem ser afectados é o coração, provocando uma insuficiência cardíaca grave e miocardite

Mais tarde (em algumas semanas apenas), surgem sintomas neurológicos e meningoencefálicos com retardação mental, devido à invasão destes parasitas. Sintomas típicos deste processo são as convulsões epilépticas, sonolência e apatia, progredindo para o coma.

Esta situação provocada pelo *T.b.rhodesiense* é quase sempre fatal em seis meses.

Na infecção por *T.b.gambiense* pode levar mais de 2 anos para que os sintomas da doença atinjam o sistema nervoso central. Os pacientes infectados com *T.b.gambiense* desenvolvem sonolência durante o dia e insónia à noite. A inacção torna-se incontrolável, à medida que a doença progride, até que o paciente se torne comatoso.

1.7.8.2 - Diagnóstico e tratamento:

O diagnóstico é feito geralmente pela detecção microscópica dos parasitas no sangue ou Líquido Cefaloraquidiano (LCR), sendo o exame parasitológico uma primeira apreciação, no local ou seja nos pequenos postos de saúde, pelas técnicas do esfregaço de sangue, técnica de Woo (1970) do microhematócrito e Buffy Coat.

A serologia é outro tipo de metodologia para o diagnóstico da doença.

Também se utiliza a inoculação do sangue em animais de laboratório, ou a detecção do seu ADN pela PCR.

Na fase aguda, o tratamento com Pentamidina é eficaz contra *T.b.gambiense* e a Suramina contra *T.b.rhodesiense*.

No entanto, a resistência é crescente a estes fármacos. Na fase cerebral, já poderá haver danos irreversíveis. É necessário usar um medicamento, o Melarsoprol, muito tóxico para os doentes que pode provocar a morte a cerca de 1-10%.dos doentes.

1.9 - Incidência da Tripanossomíase na Produção Animal em África:

A doença do sono, ou Tripanossomíase Africana nos Animais (TAA), é transmitida pela *Glossina spp* dificultando assim o desenvolvimento agrícola de uma grande parte da África.

A *Glossina morsitans morsitans*, é o vector responsável pela tripanossomíase animal ao transmitir o *Tripanossoma brucei brucei*, quando esta efectua a sua refeição sanguínea.

Com o crescimento demográfico as populações rurais, tiveram necessidade de procurarem e aumentarem as zonas para a agricultura e para o desenvolvimento pecuário, ocupando assim áreas onde era densa a presença da mosca Tsétsé.



Fig nº 37 - A Tripanossomíase Africana Animal (FAO/IAEA Programe).

As tripanossomíases dos animais domésticos aumentaram de tal forma que, não só impossibilitam a criação deste, em várias áreas, como causam graves perdas na produção, devido ao fraco crescimento, diminuição de peso e de leite, infertilidade e aborto.

A área ocupada pelas glossinas é de aproximadamente de 10 milhões de Km² na África Subsariana, tornando-se um dos maiores impedimentos para o desenvolvimento agrícola deste continente.

O problema derivado das doenças transmitidas pela Tsétsé aos animais domésticos – nagana – sobreleva em importância o da tripanossomíase humana. Esta enzootia existe em todas as áreas infestadas de tsétsé, seja qual for a espécie em causa.

Além disso todas as espécies de *Glossinas* são potentes vectores das tripanossomíases animais, se bem que a *G. morsitans* seja a mais perigosa, logo seguida pela *G. pallidipes* (Andrade e Silva, 1956)

1.10 - Recrudescência das Tripanossomíases africanas:

A tripanossomíase humana e a tripanossomíase animal ficaram sob controlo no início da década de 60 do século passado, quando a sua prevalência foi drasticamente reduzida para níveis muito baixos (OMS, 2005), com a detecção activa de novos casos e tratamento, e também com aplicação de medidas na luta anti-vectorial, utilizando equipas móveis.

Infelizmente, não foi possível sustentar os resultados de sucesso do passado devido a factores que se alteraram. Exemplos são a vigilância regular e sistemática, que é pedra angular do controlo da tripanossomíase, abandonada devido à falta cada vez maior de pessoal qualificado, a deslocação de populações na sequência de perturbações políticas e crises económicas e as mudanças de prioridades nas políticas nacionais, resultaram na afectação de menos recursos ao sector da saúde pública.

Todos estes factores e ainda uma percentagem substancial dos habitantes nos focos da endemia que deixaram de participar nas actividades de despistagem e a falta de medicamentos, contribuíram para a reemergência da doença, até níveis epidémicos.

1.11- Estratégia de Controlo e Prevenção:

Segundo a OMS (2005), o programa de estratégia para o controlo e eliminação da glossina tem como objectivo erradicar a doença como problema de Saúde Pública em África até ao ano de 2015.

A meta a atingir é a redução da morbidez e mortalidade atribuídas à doença do sono, sendo o seu principal objectivo apoiar os governos na elaboração e execução de planos e programas para controlo da doença, propondo uma abordagem integrada que consiste na vigilância epidemiológica contínua das populações em risco, na detecção passiva e activa de casos e no seu tratamento, na redução dos reservatórios animais por meio de tratamento selectivo ou em massa do gado, e na luta anti-vectorial intensiva da mosca tsé-tsé nas zonas com níveis elevados de endemia ou de epidemia.

A escolha do método de controlo depende muito da espécie de glossina, bem como do compromisso e financiamento do governo envolvido e/ou da comunidade afectada.

Contudo, para um eficaz controlo da doença, além do controlo das glossinas, há também que ter em conta o controlo nos hospedeiros, reduzindo a carga parasitária.

Uma das questões principais, é o reconhecimento e definição do exacto problema numa determinada região, organizando estudos de campo, com objectivos bem definidos relacionados com o local (extensão, a severidade, a prevalência e a incidência da doença).

Uma avaliação sócio-económica deve ser também realizada, local a local para uma tomada de decisões, tanto a nível de metodologias a usar como a nível económico.

A estratégia de programas informativos e educacionais às populações sobre saúde e metodologias possíveis de utilização nas aldeias rurais, o seu envolvimento participativo ao longo de todo o processo, são questões importantes a ter em conta.

Finalmente, a eficácia destas intervenções só poderão ter êxito com a avaliação contínua no terreno.

A vigilância médica regular das populações expostas constitui a base do método de luta, uma vez que se identificam os doentes num estado precoce, aumentando as probabilidades de cura, reduz os reservatórios e funciona como um dos indicadores epidemiológicos, permitindo prevenir situações epidémicas.

No controlo de populações de glossinas, devem ser utilizadas várias metodologias, tais como: armadilhas, telas impregnadas com insecticidas, iscas vivas com animais de grande porte, aspersão sequencial aéreo, carros patrulha, libertação de machos estéreis e outras.

Métodos tradicionais incluem a eliminação de arbustos para destruir o habitat da tsétsé e a pulverização com insecticidas pelo ar ou sobre o solo, métodos que têm sido alvo de críticas devido aos efeitos prejudiciais irreversíveis no ambiente.

Métodos menos prejudiciais ao ambiente incluem o uso de armadilhas, como por exemplo as chamadas iscas vivas, onde o insecticida é impregnado sobre animais, cujo objectivo é o de a eliminar, quando esta entra em contacto com os animais para se alimentar.

Um outro método, para captação de glossinas, o chamado “man fly-round” (Shereni, 1984), que traduziremos por rondas de captura.

Uma ronda de captura, consiste na utilização de uma tela impregnada com insecticida, que se vai deslocando por caminhos conhecidos da presença da glossina.



Fig. nº 38 - Armadilha viva utilizando animais.



Fig. nº39 - Ronda de captura.

(Tsetse.FAQ).

O veículo patrulha é também uma outra técnica que foi anteriormente utilizada como forma semi-quantitativa. O método consiste na utilização de um veículo que percorre áreas de glossina, utilizando uma armadilha de rede electrificada (Vale, 1974).



Fig. nº 40 - Veículo patrulha (Tsetse FAQ).

Quanto ao derrube, actualmente, as acções sobre a vegetação, devem ser selectivas em locais muito específicos, tais como à volta de certas plantações e aldeias.

As derrubas totais, de grandes dimensões, assim como a eliminação da fauna local, presentemente, por razões ecológicas, não são aceitáveis.

1.11.1-Telas e Armadilhas:

Constituem sistemas de captura artificial de glossinas, visando a atracção e a retenção das mesmas



Fig. nº 41 - Diferentes tipos de armadilhas para a captura de glossinas (Tsetse FAQ).

Fundamentam-se essencialmente em três tropismos conhecidos:

Estereotropismo – atracção pelo vulto

Esciotropismo – atracção pela sombra

Fototropismo – atracção pela luz (Travassos Santos Dias, 1992).

As armadilhas têm diferentes funções: podem capturar glossinas, permitindo amostras para diversos estudos, ou capturar e matar, quando impregnadas com insecticidas.

1.11.2 – Prevenção da doença e estratégias no controlo das glossinas:

Para a prevenção da tripanossomose humana e ou animal, e como já foi referido, são também, necessárias tomadas de atitude pelas populações envolvidas; elaborando, formação adequada, campanhas de sensibilização e mobilização das comunidades envolvidas e expostas, para que, possam colaborar e compreender a doença.



Fig. nº 42 - Formação (Tsetse FAQ)

A utilização de armadilhas caseiras proposta pelo Tearfund International Learning Zone, utilizando garrafas plásticas na construção de armadilhas para glossinas e colocando-as em círculo à volta da aldeia, é uma medida que pode ser utilizada pelas comunidades rurais.

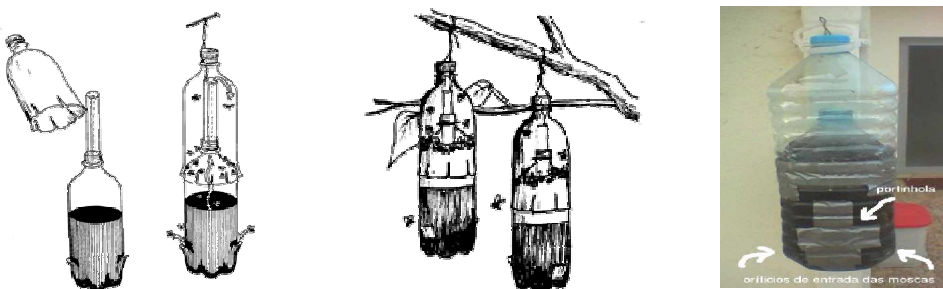


Fig. nº 43 - Diferentes tipos de armadilhas artesanais.

(Tearfund Int. Learning Zone)

As glossinas, ao contrário de quase todos os outros insectos que picam humanos, são mais activas de dia, logo dormir sob redes, apesar de aconselhado, não é protecção eficaz.

É necessário usar roupas que cubram a maior parte da pele e “sprays” repelentes de insectos. O uso de aparelhos coloridos eléctricos, que atraem e matam as moscas é também um tipo de armadilha útil, embora não seja possível o seu uso em grande parte das zonas rurais de África.

A doença do sono pode também ser prevenida através de um controlo eficaz da mosca tsétsé. A fêmea desta mosca produz apenas cerca de 10 larvas durante o seu curto período de vida.

Em teoria, prevenir a disseminação da doença do sono através do controlo de moscas tsétsé deveria ser uma alternativa eficaz, uma vez que a destruição das populações das glossinas é fundamental para a erradicação da doença.

1.12 – Objectivos do Trabalho

A dinâmica da evolução cíclica dos tripanossomas africanos nos seus vectores, insectos do género *Glossina*, o habitat, comportamento trófico e morfologia têm constituído, temas de várias investigações.

A nossa dissertação tem como objectivo principal, iniciar e contribuir, com uma primeira abordagem, para o estudo da caracterização molecular das *Glossinas morsitans morsitans* Westwood, 1850 (Díptera, Glossinidae) da colónia existente no insectário da UEM/IHMT de Lisboa.

Para esse efeito começámos por formar uma nova colónia de *Glossina morsitans morsitans*, a que demos o nome de “Colónia Experimental”, tendo como base a colónia, acima referida com intenção de usar os resultados obtidos através do estudo desta nova colónia, para neles basear as conclusões apresentadas nesta dissertação.

O outro objectivo é investigar o *sex ratio* das glossinas macho e fêmea eclodidas à nascença na já referida “Colónia Experimental”.

Para uma melhor compreensão do alcance e importância dos objectivos mencionados, faremos um historial das *Glossina morsitans morsitans*, sua expansão geográfica e extensão dos danos por ela causados em grande número de populações humanas e animais.

II - MATERIAL E MÉTODOS:

2.2 - MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

2.2.1 - *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 (Díptera, Glossinidae):

Em todos os ensaios laboratoriais realizados foram utilizadas glossinas fêmea e macho da colónia de *Glossina morsitans morsitans* existentes no insectário da UEM/IHMT, sendo responsável científico daquela unidade o Professor Doutor A. J. dos Santos Grácio.

A presente colónia foi iniciada há mais de uma década, a partir de pupas de *G. m. morsitans*.



Fig. nº 44 - Colónia de *G. morsitans morsitans* Westwood, 1850 - insectário da UEM/IHMT.

(Foto da autora).

2.3 - Principais técnicas de manutenção da colónia de *G. m. morsitans*:

2.3.1 - Instalações e condições ambientais:

A sala do insectário onde se encontram as glossinas tem características específicas e controladas para a boa manutenção e qualidade da colónia.

Um dos factores importantes é a temperatura ambiente que deve estar estabilizada entre os 25°C +/- 1°C, com uma humidade relativa entre os 70% -75%.

As glossinas estão expostas a períodos de luz artificial de doze horas e a períodos de doze horas de completa escuridão.

2.3.2-Técnicas de alimentação:

A alimentação *in vivo* das glossinas é efectuada em cobaios, *Cavia* (Rodentia, Cavidae), colocados previamente em alimentadores. Todos os adultos efectuem uma refeição sanguínea (RS) três vezes por semana, (Segunda, Quarta e Sexta-feira) permanecendo nos alimentadores pelo menos 10 a 15 minutos.

Para efectuar a sua alimentação a glossina utiliza mecanismos com os quais conseguem ingerir grande quantidade de sangue. São exemplo as substâncias anti-hemolíticas como a Aspirase (inibe a agregação plaquetária) e substâncias anti-trombina, como já referido.

2.3.3 - Técnicas de engaiolamento dos adultos e recolha das pupas:

As glossinas adultas são colocadas em gaiolas do tipo Robaud. Estas são revestidas por um tule branco para as glossinas fêmea eclodidas, que posteriormente são também utilizadas para o acasalamento.

Há gaiolas que são revestidas por tule negro onde são colocados apenas os machos eclodidos



Fig. nº 45 - Gaiola para glossina macho IHMT.

(Foto da autora)

Uma outra metodologia utilizada e muito importante para a eficácia e controlo da colónia de glossinas são os registos da população existente, dos acasalamentos, das posturas e posteriores eclosões. Estes registos protocolares e informativos são colocados em cada gaiola, usando etiquetas com as seguintes informações:

- número da gaiola e ano decorrente;
- número dos machos e das fêmeas;
- data de acasalamento.

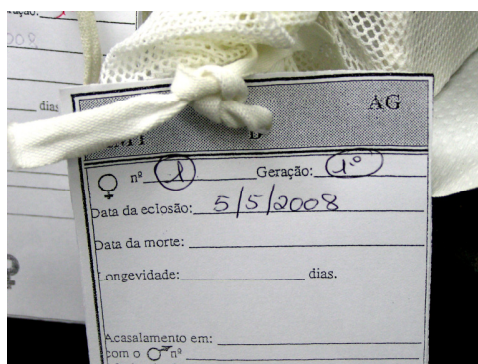


Fig. nº 46 - Registo protocolar numa gaiola.

(Foto da Autora - IHMT).

Uma outra metodologia utilizada é colocar a gaiola que já contém glossinas fêmea e macho para acasalamento com uma ligeira inclinação sobre uma tina plástica, (Fig. nº47), para que a larva possa cair na tina e consequentemente ser colectada. As tinas funcionam como colectores de pupas.

Os adultos mortos encontrados nas gaiolas são retirados.



Fig.nº 47 - Gaiola de glossinas.

(Foto da Autora - IHMT).

2.3.4 - Técnica de acondicionamento das pupas:

Após a colecta das pupas, estas são colocadas em frascos de vidro transparente, com tampas plásticas perfuradas. Nestes frascos coloca-se areia de grão fino ligeiramente humedecida até cerca de 2 cm de altura, sendo as pupas colocadas mais ou menos a 1cm de profundidade.

Cada frasco é devidamente identificado com a data da postura e o número de pupas colocadas. Este controlo é também importante por nos poder dar uma estimativa de glossinas eclodidas por cada frasco.



Fig. nº 48 - Larvas e pupas.



Fig. nº 49 - Acondicionamento de pupas.

(Fotos da autora - IHMT).

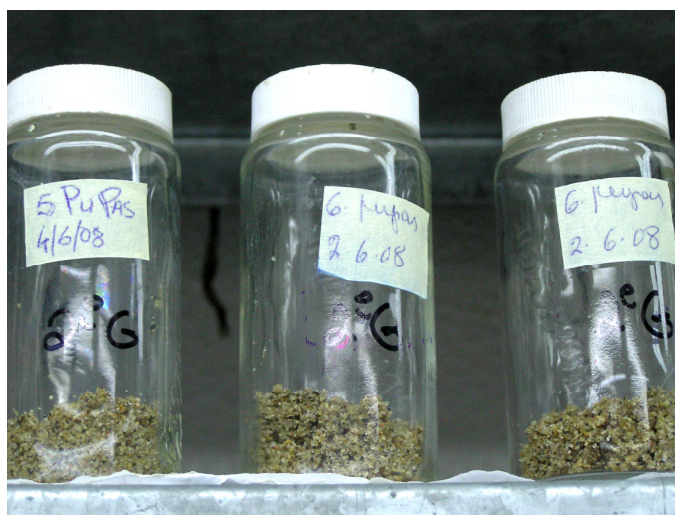


Fig. nº 50 - Frascos com pupas para a formação da “Colónia Experimental”.

(Foto da autora – IHMT).

2.3.5 - Técnica da recolha dos adultos eclodidos:

Após a eclosão, as glossinas adultas vão sendo retiradas para as gaiolas respectivas.

Retirar as glossinas dos frascos onde eclodiram é uma técnica simples mas que requer habilidade do técnico, assim como conhecimentos científicos para, numa primeira fase, separar por sexo as glossinas e colocá-las nas respectivas gaiolas.

Estas glossinas são alimentadas, como já referido, e após três a quatro dias os adultos macho são transferidos, se possível em igual número, para gaiolas de cor branca onde se encontram as glossinas fêmea para acasalamento.

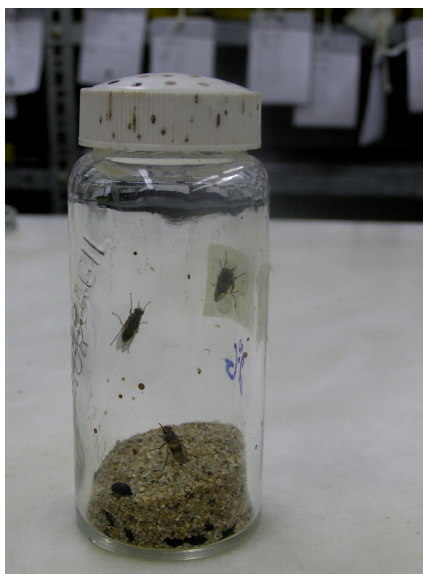


Fig. nº 51 - Eclosão de glossinas..



Fig. nº 52 - Transferência para uma gaiola de uma glossina teneral, utilizando um tubo de ensaio.

(Fotos da autora - IHMT).

2.3.6 - Regras de higiene e segurança para a manutenção da colónia:

Manter uma colónia saudável requer procedimentos metódicos para a longevidade e reprodução das glossinas.

Tanto a higiene da sala, das gaiolas, tinas, frascos, tubos de ensaio ou de qualquer outro material que seja manuseado, deve ser cuidadosa para evitar o desenvolvimento, por exemplo, de fungos.

Outros cuidados que também são muito importantes para a manutenção da colónia são as condições ambientais. Um outro factor a ter em conta é não manipular produtos tóxicos dentro da sala, como por exemplo, o uso de produtos de limpeza com amónia e lixívia.

Ainda outro factor para uma eficaz manutenção da colónia, são os cuidados de higiene e de saúde com os cobaios utilizados para a alimentação sanguínea que devem estar em boas condições nutricionais e não deverão nunca estar sujeitos a antibióticos ou outros fármacos. Estes cobaios são criados e mantidos no biotério do IHMT.

2.4 - Amostra:

2.4.1 - Colónia de *Glossina morsitans morsitans* utilizada como amostra no estudo:

A amostra utilizada, para o estudo deste trabalho, foi retirada da “Colónia Experimental” de *Glossina morsitans morsitans*, criada a partir da colónia já existente no IHMT cujas características foram descritas anteriormente.

Iniciar e contribuir, com uma primeira abordagem, para o estudo da caracterização molecular das *Glossinas morsitans morsitans* Westwood, 1850, da colónia que se encontra no IHMT, é um dos objectivos da nossa dissertação.

Assim e nesse âmbito, a amostra utilizada para a análise molecular é de exemplares de diferentes gerações.

O trabalho realizado na colónia para esta dissertação, iniciou-se em meados do mês de Maio a Agosto de 2008. Durante todo esse período, e para além de todos os procedimentos de controlo já mencionados, as diferentes gerações foram separadas e os exemplares de cada geração foram devidamente contados.

Este procedimento deu a oportunidade de realizar um estudo sobre o *sex ratio* nas três gerações da “Colónia Experimental”.

Para a formação da “Colónia Experimental”, foram colectadas da colónia original, um total de (134) pupas, que foram colocadas em frascos próprios devidamente rotulados e datados. Estas primeiras 134 pupas foram consideradas **a primeira geração.**

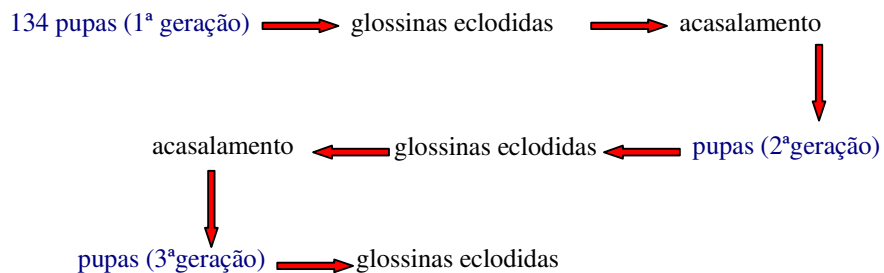


Fig.nº 53 – A formação da “Colónia Experimental”.

Gaiolas com glossinas e frascos com pupas de 1ª geração em baixo e 2ª geração (pupas) em cima
(Foto da Autora - IHMT).

2.4.2 – Metodologia utilizada na formação das três gerações da “Colónia Experimental”:

Metodologia utilizada, na formação das diferentes gerações de glossinas da “Colónia Experimental”, para posteriores estudos e segundo o esquema:



2.4.3 – Metodologia utilizada para o estudo do *sex ratio* da “Colónia Experimental” de glossinas:

Para a realização e avaliação da proporção sexual, *sex ratio*, ou relação entre o número de machos e o de fêmeas, elaboraram-se gráficos e tabelas.

Para este estudo foram contados todos os exemplares eclodidos, fêmeas e machos, e de pupas não eclodidas por geração.

Foi feito o cálculo do Qui-quadrado aplicado às três gerações em estudo, assim como aos intervalos de confiança com a aplicação do programa Primer 92.

2.4.4 – Metodologia utilizada para recolha de amostras de glossinas a utilizar no estudo da análise molecular:

Para este estudo foram colectadas de cada geração de glossinas fêmea e macho eclodidas sem realizarem a primeira refeição sanguínea (glossinas tenerais), para posterior análise molecular.

Os exemplares recolhidos eram conservados em recipientes de vidro, contendo etanol, devidamente rotulados e datados.

2.5 - Análise molecular dos exemplares de *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850:

2.5.1. – Amostras utilizadas:

A amostra é constituída, como referido, por glossinas tenerais, fêmea e macho das diferentes gerações que posteriormente serão dissecadas.

O processo de amostragem foi aleatório simples.

Foram utilizadas *Glossinas morsitans morsitans*, obtidas a partir da 1^a, 2^a e 3^as, gerações, da “Colónia Experimental”, mantidas no insectário da UEM/IHMT.

Após a dissecação da glossina, esta foi separada em diferentes partes:

- cabeça, tórax e abdómen, serão utilizados para a extracção do Ácido Desoxirribonucleico (ADN) genómico.

- as patas e asas foram desprezadas.

2.5.2. – Extracção do ADN genómico:

2.5.2.1 – Principio do método:

A extracção do ADN genómico foi realizada, com base no método de CTAB (Krafsur & Wohlford, 1999, Stothard, 1996) com algumas modificações.

2.5.2.2 – Metodologia:

Os exemplares (cabeça, tórax e abdómen) de *G. morsitans morsitans*, foram colocados individualmente em tubos “Eppendorf” de 1,5 ml e foi-lhes adicionado 600 µl de tampão de extração (CTAB – Cetyltrimethylaminomium Bromide) ao qual se adicionaram 10 µl de Proteinase K.

Procedeu-se à homogeneização das amostras através de maceração utilizando para isso material próprio chamado de “esmagador”

Depois de muito bem homogeneizadas, as amostras foram deixadas na estufa à temperatura de 60° C durante 60 minutos, sendo agitadas várias vezes para uma boa homogeneização.

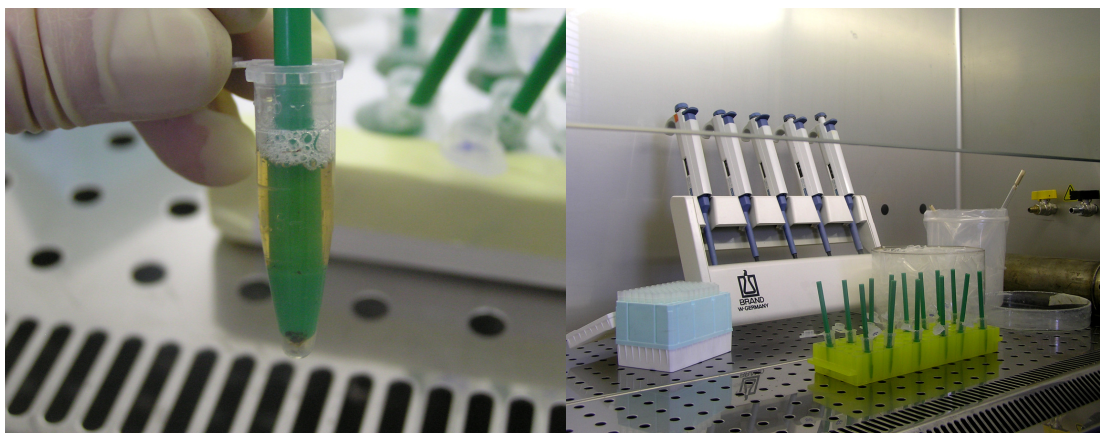


Fig. nº 54 – Homogeneização das amostras

Em seguida e após um período de incubação, adicionou-se 750 µl de Chloroform/Isoamylalcohol (24:1), misturando-se suavemente durante dois minutos.

Centrifugou-se rapidamente, para que haja a separação da zona aquosa da zona orgânica, separando o sobrenadante (zona aquosa) para novos tubos de “Eppendorf”,

adicionando 1ml de etanol absoluto frio a cada uma das amostras, misturando-se suavemente.

As amostras são novamente centrifugadas durante 15 minutos a 14 000 rpm.

O sobrenadante obtido foi desprezado por decantação, adicionou-se a cada amostra 0,5 ml de etanol a 70% para a lavagem das “pellets”, sendo as amostras centrifugadas mais uma vez nas mesmas condições já referidas.

Rejeita-se novamente todo o sobrenadante e deixa-se evaporar todo o excesso de etanol. Após a evaporação total do etanol, adicionou-se 50 µl de tampão Tris-EDTA (TE).

As amostras são guardadas a -20°C até posteriores utilizações.

2.5.3. – Amplificação do ADN genómico:

A amplificação do ADN genómico das glossinas foi realizada por reacção de PCR (Polymerase Chain Reaction), aplicada ao gene mitocondrial COI (Cytochrome Oxidase sub-unit1).

Os fragmentos do gene COI foram amplificados utilizando os oligonucleótidos universais descritos por Folmer *et al* (1999) com as seguintes sequências (Tabela nº 3):

Gene alvo	Oligonucleotidos	Sequência nucleotídica
COI	COI 1	5' ggtcaacaaatcataaagatattgg 3'
	COI 2	5' taaacttcagggtgaccaaaaaatca 3'

Tabela nº 3 - Sequência nucleotídica e o gene alvo utilizados no presente trabalho.

As reacções de amplificação do gene COI foram efectuadas em volumes de 25µl utilizando o kit “PuReTaq™ ready-To-Go™ PCR beads” comercializado pela “GE Healthcare”.

Em cada reacção de PCR foi também incluída uma amostra negativa (sem ADN) que serviu de controlo negativo. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador “AVISO®”, GmbH Mechatronic Systems).

As amplificações foram realizadas da seguinte maneira:

- 1 - um passo de desnaturação a 95°C durante 5 minutos,
- 2 - seguindo-se 37 ciclos de amplificação a 95°C durante 15 segundos, e a 58° C durante 30 segundos,
- 3 - 72°C durante 90 segundos e,
- 4 - uma extensão final de 72°C durante 5 minutos.

2.5.4. – Electroforese em gel de agarose:

Após a amplificação, os fragmentos de ADN foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM EDTA 1mM: pH:8,3), onde foi incorporado brometo de etídio, numa concentração de 0,5 µg/ml.

Juntamente com os produtos de PCR, foi também adicionado um marcador de massa molecular “HyperLadder II” (Bioline).

As amostras foram preparadas com 6 µl de produto de PCR ao qual se adicionou 1µl de tampão (Azul de Bromofenol com glicerol).

A migração foi realizada a 120 V durante, aproximadamente 30 minutos.

Os fragmentos de ADN amplificados foram visualizados sob radiação ultravioleta (UV) por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado do ADN, numa cabine “Alfalmager® HP, Alpha Innotech”.

2.5.5. – Purificação e sequenciação dos produtos amplificados:

Os produtos da PCR amplificados foram enviados para purificação e posterior sequenciação para a empresa STABVIDA (FCT, UNL), e foram sequenciados para ambos os sentidos, com o recurso aos oligonucleótidos COI1 e COI2.

2.5.6. Análise das sequências:

As sequências nucleótídicas ainda que parciais obtidas para o gene COI, foram analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), que permitiu a pesquisa de sequências homólogas depositadas nas bases de dados de acesso público (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

As sequências obtidas, quer as de *Glossina morsitans morsitans*, quer as que se obtiveram com o recurso ao GenBank, foram alinhadas com o apoio do programa ClustalW (Thompson, et al, 1994), ainda que alguns ajustes tenham sido introduzidos manualmente. A estimativa do número médio de diferenças nucleotídicas (**K**), a diversidade nucleotídica (**π**) e a diversidade de haplotipos (**Hd**) foram analisados de acordo com Nei (1987) com o apoio do programa DnaSP 4.10.7 (Rozas *et al*, 2003).

•

III – RESULTADOS:

3.1 – Introdução:

Os resultados obtidos durante a formação da colónia de *Glossinas morsitans morsitans*, para o presente estudo, deram também a oportunidade como referido nos nossos objectivos, de realizar alguns estudos sobre a população de glossinas da “Colónia Experimental” em estudo, nomeadamente aos adultos eclodidos, segundo o género, nas diferentes gerações, bem como ao número de pupas não eclodidas.

Dos resultados obtidos foi também possível determinar o *sex ratio* das três gerações como era nosso objectivo e a partir dos quais foi possível elaborar um conjunto de gráficos e de quadros para uma melhor clarificação.

3.2 - Estudos de glossinas eclodidas macho e fêmea, por geração:

3.2.1 – Primeira geração:

A 1ª geração decorre de Maio de 2008 a meados de Junho de 2008 com um número de pupas de (N=134), colocadas em frascos próprios, numerados e datados, consoante o procedimento utilizado na colónia de glossinas do IHMT. Neste conjunto de pupas procederam-se a estudos relacionados com o número de glossinas adultas eclodidas, fêmea e macho, assim como o número de pupas não eclodidas.

Foram utilizados 15 frascos, devidamente identificados, numerados e datados, contendo cada um determinado número de pupas (Anexo 1).

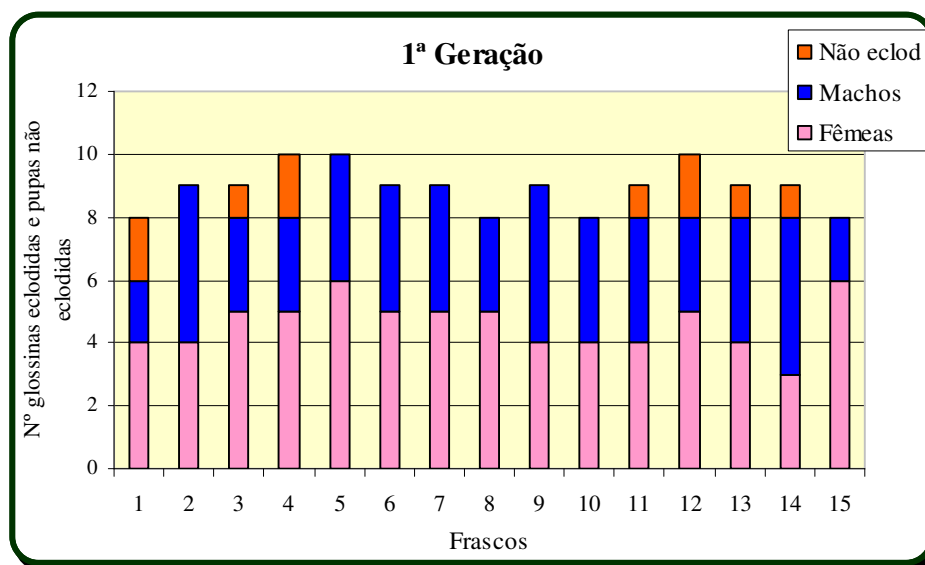


Gráfico nº 1 - Representação gráfica de glossinas macho e fêmea eclodidas e de pupas não eclodidas na 1ª geração.

Nesta geração, verificou-se que as glossinas fêmea que eclodiram são em número superior às das glossinas macho eclodidas, como se comprova no seguinte quadro:

Número de glossinas macho eclodidas = 55; (41%)
Número de glossinas fêmea eclodidas = 69; (51,5%)
Número de pupas não eclodidas = 10; (7,4%)

Quadro nº1 - Totais e percentagens de glossinas e pupas na 1ª geração

Na 1ª geração, a relação do *sex ratio* à nascença de glossinas macho e glossinas fêmea é de **1:1,3**.

3.2.2 – Segunda geração:

Durante o mês de Junho de 2008, obtiveram-se os primeiros adultos eclodidos e após o seu acasalamento, as pupas resultantes iniciam a **2ª geração**.

Após a eclosão e contagem de glossinas macho, glossinas fêmea e de pupas não eclodidas (Anexo 2), a amostra para o estudo desta geração é de N=85; conforme se apresenta no gráfico seguinte:

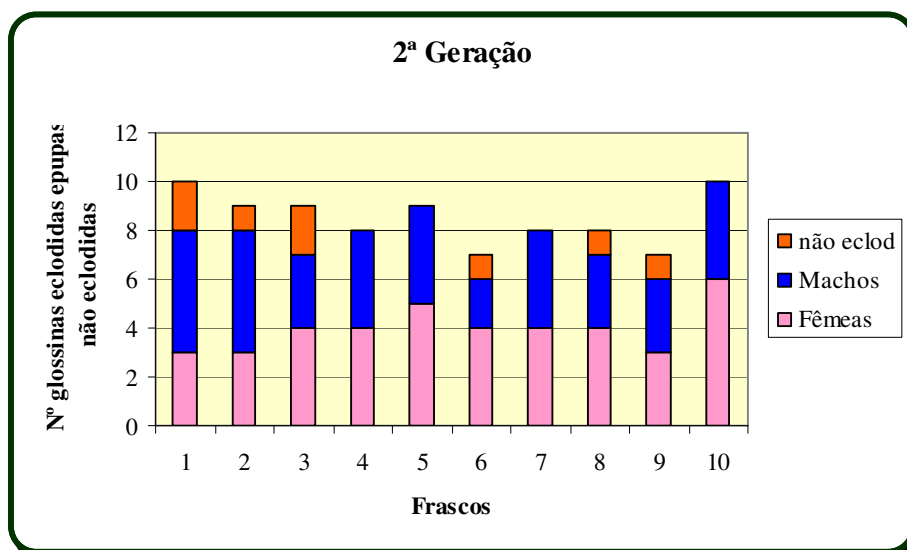


Gráfico nº 2 - Representação gráfica de glossinas macho e fêmea eclodidas e de pupas não eclodidas na 2ª geração.

Verificou-se também que as glossinas fêmea que eclodiram são em número superior às das glossinas macho eclodidas, segundo o seguinte quadro:

Número de glossinas macho eclodidas = 37; (43,5%)
Número de glossinas fêmea eclodidas = 40, (47%)
Número de pupas não eclodidas = 8; (9,4%)

Quadro nº2 - Totais e percentagens de glossinas e pupas na 2ª geração

Como pode ser verificado no quadro nº2, há também um maior número de glossinas fêmea eclodidas, sendo a relação *sex ratio* à nascença desta geração de **1:1,1**.

3.2.3- Terceira geração:

Durante e ao longo dos meses de Julho de 2008 a meados de Agosto de 2008 deu-se início à **3ª geração**

Para o estudo desta geração a amostragem é de N=132, conforme Anexo 3, dando origem ao seguinte gráfico:

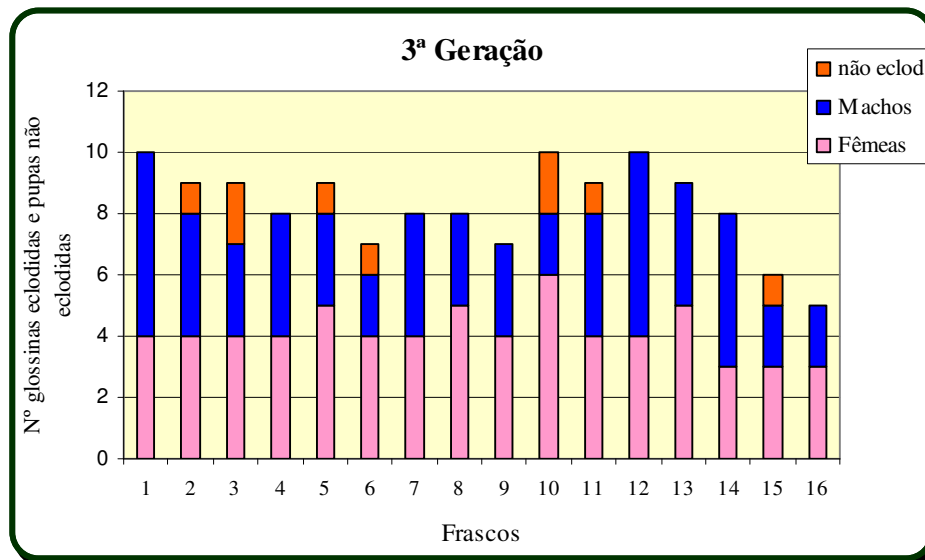


Gráfico nº 3 - Representação gráfica de glossinas macho e fêmea eclodidas e de pupas não eclodidas na 3ª geração.

Verificou-se novamente que as glossinas fêmea que eclodiram na 3ª geração são em número superior às das glossinas macho eclodidas, como se verifica no seguinte quadro:

Número de glossinas macho eclodidas = 57; (43,2)
Número de glossinas fêmea eclodidas = 66; (50%)
Número de pupas não eclodidas = 9; (6,8%)

Quadro nº3 - Totais e percentagens de glossinas e pupas na 3ª geração

A terceira geração de glossinas macho e fêmea mantém o mesmo padrão das gerações anteriores, sendo a relação do *sex ratio* desta geração de **1:1,2**.

3.3 – Estudo das glossinas macho e fêmea eclodidas e de pupas não eclodidas por geração:

Com este estudo, pretendemos mostrar, relativamente às três gerações, qual a que apresenta um maior número e percentagem de glossinas eclodidas macho, fêmea e de pupas não eclodidas por geração.

3.3.1 – Relação de glossinas macho eclodidas por geração:

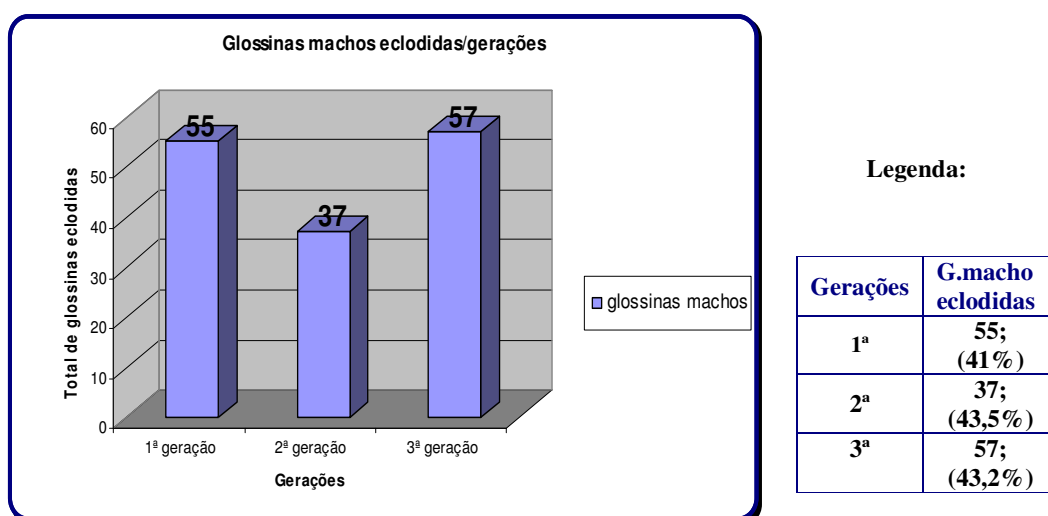


Gráfico nº4 - Representação gráfica das glossinas macho eclodidos nas três gerações.

O gráfico nº 4, mostra-nos, em cada geração estudada, os valores obtidos, tanto em número de glossinas eclodidas como as respectivas percentagens, em relação às amostras.

Assim na 1ª geração eclodiram 55 machos (41%), numa amostra de N=134.

Na 2ª geração apenas eclodiram 37 machos (43,5%), em N=85, sendo a terceira geração aquela onde se obtiveram o maior número de machos eclodidos 57 (43,2%).

Contudo, neste estudo também se verificou que em termos percentuais foi na 2ª geração que se obteve maior amostra de machos eclodidos.

3.3.2 – Relação de glossinas fêmea eclodidas por geração:

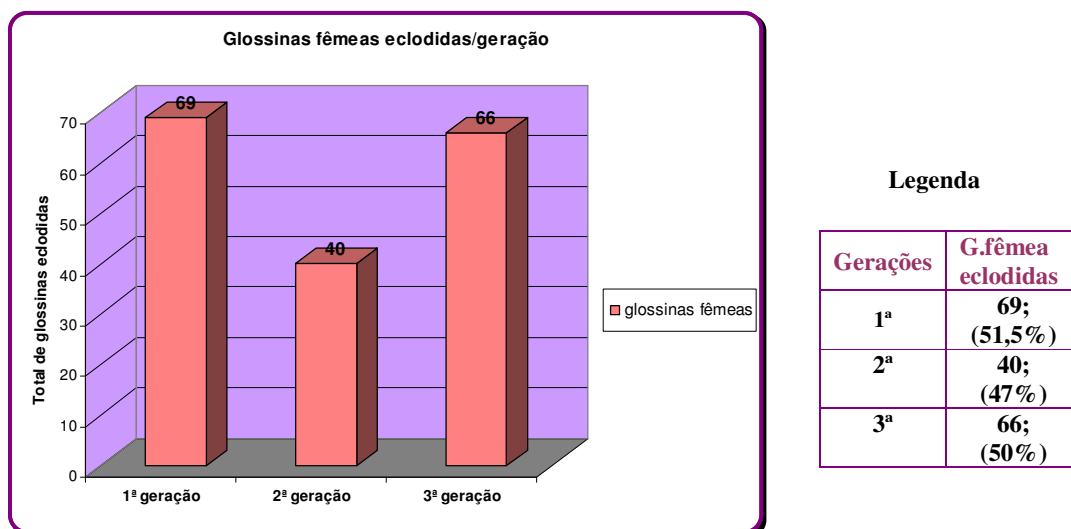


Gráfico nº5 - Representação gráfica das glossinas fêmea eclodidas nas três gerações.

O Gráfico nº 5 representa o total de glossinas fêmea eclodidas por geração.

Com a apresentação desta relação de glossinas fêmea eclodidas por geração, podemos verificar que a percentagem entre a 1ª geração e a 3ª geração é muito idêntica, sendo a 2ª geração a que obteve menor percentagem de glossinas fêmea eclodidas.

3.3.3 - Relação de pupas não eclodidas por gerações:

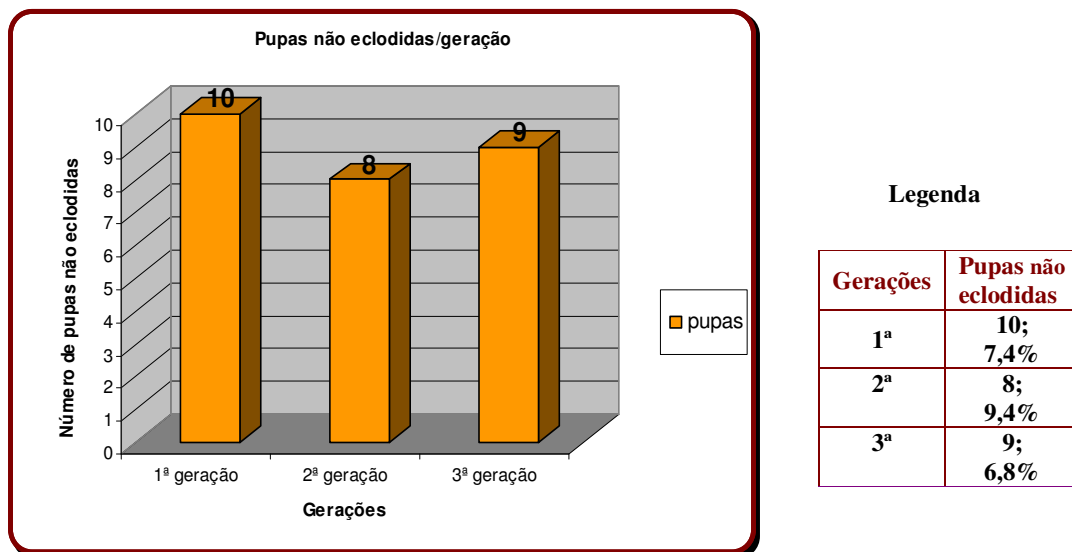


Gráfico nº6 - Representação gráfica de pupas não eclodidas nas três gerações.

O gráfico nº 6, representa as pupas não eclodidas nas três gerações.

É na 2ª geração onde a percentagem de pupas não eclodidas foi maior (9.4%).

3.3.4 – Relação das glossinas macho e fêmea eclodidas e pupas não eclodidas nas três gerações estudadas:

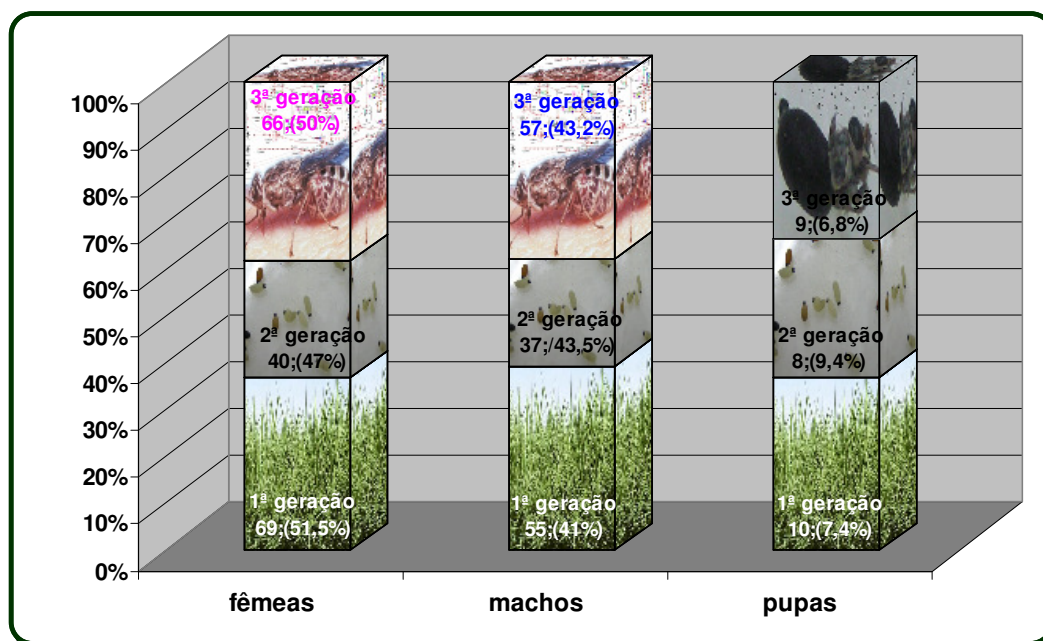


Gráfico nº 7 – Representação das três gerações de glossinas fêmea e macho eclodidas e de pupas não eclodidas.

Neste gráfico estão representadas as três gerações estudadas, as glossinas fêmea eclodidas, as glossinas macho eclodidas e as pupas não eclodidas, com os números totais e percentagens de cada geração.

3.3.5 – Cálculos da proporção das glossinas macho e fêmea eclodidas nas três gerações:

Do número total de glossinas macho e de glossinas fêmea eclodidas, das gerações em estudo, fizeram-se alguns cálculos, assim:

- A percentagem de cada grupo de glossinas fêmea eclodidas é de 54%;
- A percentagem para o grupo de glossinas macho eclodidas é de 46%,

como se pode verificar na tabela seguinte.

Gerações	Machos	Fêmeas	
1^a	55	69	
2^a	37	40	
3^a	57	66	
Total	149	175	324
Percentagem	46%	54%	

Tabela nº 4 – Total e percentagem das glossinas nas três gerações.

A proporção de fêmeas (54%), com um intervalo de confiança de 95%, é de 48,5% a 59,5%, com um erro padrão da estimativa de 2,8%.

3.4 – Estudos da análise molecular das *Glossinas morsitans morsitans* Westwood, 1850:

3.5. – Selecção das amostras:

Para o presente estudo foram utilizados 50 exemplares de *Glossina morsitans morsitans* tenerais (do insectário da Unidade de Entomologia Médica do IHMT), obtidas durante três gerações.

3.6. – Análise molecular das amostras:

3.6.1. – Amplificação do gene COI do ADN mitocondrial (mtDNA):

Em todas as amostras estudadas, observou-se um fragmento com um peso molecular de aproximadamente de 680 pb. (Figura 55).

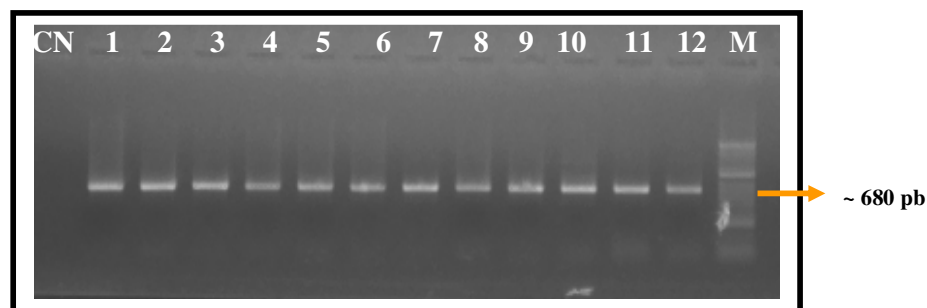


Fig. nº 55 - Visualização do gel de agarose a 1% dos produtos da PCR para o gene COI dealgumas das amostras da população de *G. morsitans morsitans*. CN- controlo negativo;1-12 amostras da população de *G. m morsitans*.

3.6.2. – Sequenciação das amostras amplificadas

As sequências nucleotídicas obtidas, ainda que parciais para as diferentes amostras, foram alinhadas e agrupadas, com a introdução de ajustes introduzidos manualmente (Figura 56).

```

G.m.morsitans1 AAC CTC TTT AAG AAT TTT AGT ACG AGC TGA ATT AGG GCA TC CAG GAG C
G.m.morsitans 2 A.. ... ..
G.m.morsitans 3 C.. ... ..
G.m.morsitans 4 T.. ... ..
G.m.morsitans 5 A.. ... ..
G.m.morsitans 6 A.. ... ..
G.m.morsitans 7 A.. ... ..
G.m.morsitans 8 A.. ... ..
G.m.morsitans 9 A.. ... ..
G.m.morsitans 10 A.. ... ..
G.m.morsitans 11 A.. ... ..

G.m.morsitans 1 AT TAA TTG GAG ATG ATC AAA TTT ATA ATG TAA TTG TTA CAG CTC ATG C
G.m.morsitans 2 .. ... ..
G.m.morsitans 3 .. ... ..
G.m.morsitans 4 .. ... ..
G.m.morsitans 5 .. ... ..
G.m.morsitans 6 .. ... ..
G.m.morsitans 7 .. ... ..
G.m.morsitans 8 .. ... ..
G.m.morsitans 9 .. ... ..
G.m.morsitans 10 .. ... ..
G.m.morsitans 11 .. ... ..

G.m.morsitans 1 AT TCG TTA TAA TTT TTT TTA TAG TAA TAC CTA TTA TAA TTG GAG GTT T
G.m.morsitans 2 .. ... ..
G.m.morsitans 3 .. ... ..
G.m.morsitans 4 .. ... ..
G.m.morsitans 5 .. ... ..
G.m.morsitans 6 .. ... ..
G.m.morsitans 7 .. ... ..
G.m.morsitans 8 .. ... ..
G.m.morsitans 9 .. ... ..
G.m.morsitans 10 .. ... ..
G.m.morsitans 11 .. ... ..

G.m.morsitans 1 TG GAA ATT GAT TAG TTC CTT TAA TGC TAG GAG CTC CTG ATA TAG CAT T
G.m.morsitans 2 .. ... ..
G.m.morsitans 3 .. ... ..
G.m.morsitans 4 .. ... ..
G.m.morsitans 5 .. ... ..
G.m.morsitans 6 .. ... ..
G.m.morsitans 7 .. ... ..
G.m.morsitans 8 .. ... ..
G.m.morsitans 9 .. ... ..
G.m.morsitans 10 .. ... ..
G.m.morsitans 11 .. ... ..

```

Fig. nº 56 - Alinhamento das sequências nucleotídicas parciais analisadas para o gene COI do ADN mitocondrial.

[illegible][illegible]

<i>G.m.morsitans</i> 1	GG	GAA	TTT	CCT	TTG	ATC	GAA	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 2	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 3	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 4	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 5	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 6	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 7	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 8	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 9	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 10	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T
<i>G.m.morsitans</i> 11	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	T

Fig. nº56 – Cont. - Alinhamento das sequências nucleótídicas parciais analisadas para o gene COI do ADN mitocondrial.

As sequências ainda que parciais analisadas, apresentaram três haplotipos diferentes, tendo-se classificado em **Hap1**, **Hap2** e **Hap3**. (assinalados na **Figura.56**).

O **Hap2** foi identificado na amostra *G.m.morsitans* 3 e o **Hap3** foi identificado na amostra *G.m.morsitans* 4. Nas restantes amostras foi identificado o **Hap1**, como se pode observar na Figura 56.

O cálculo da diversidade nucleótídica para o conjunto das amostras foi de $\pi=0.006$ enquanto para a diversidade haplotípica foi $Hd= 0.345 \pm 0,172$. O número de diferenças entre nucleotidos (**K**) foi de 0,345.

As sequências obtidas para as amostras de *Glossina morsitans morsitans* foram depois alinhadas em conjunto com as sequências homólogas para o mesmo gene em estudo, disponíveis na base de dados (GenBank).

EF 531200.1	AAC ATC TTT AAG AAT TTT AGT ACG AGC TGA ACT AGG GCA TC CAG GAG C
<i>G.m.morsitans</i> 1	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 2	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 3	C. . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 4	T. . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 5	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 6	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 7	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 8	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 9	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 10	. . . C.T.
<i>G.m.morsitans</i> 11	. . . C.T.
EF 531200.1	AT TAA TTG GAG ATG ATC AAA TTT ATA ATG TTA TTG TTA CAG CTC ATG C
<i>G.m.morsitans</i> 1A.
<i>G.m.morsitans</i> 2A.
<i>G.m.morsitans</i> 3A.
<i>G.m.morsitans</i> 4A.
<i>G.m.morsitans</i> 5A.
<i>G.m.morsitans</i> 6A.
<i>G.m.morsitans</i> 7A.
<i>G.m.morsitans</i> 8A.
<i>G.m.morsitans</i> 9A.
<i>G.m.morsitans</i> 10A.
<i>G.m.morsitans</i> 11A.
EF 531200.1	GT TTG TTA TAA TTT TTT TTA TAG TAA TAC CTA TTA TAA TTG GAG GAT T
<i>G.m.morsitans</i> 1	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 2	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 3	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 4	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 5	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 6	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 7	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 8	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 9	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 10	A. .C. .T. . .
<i>G.m.morsitans</i> 11	A. .C. .T. . .
EF 531200.1	TG GAA ACT GAT TAG TTC CTT TAA TGT TAG GAG CCC CTG ATA TAG CAT T
<i>G.m.morsitans</i> 1T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 2T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 3T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 4T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 5T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 6T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 7T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 8T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 9T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 10T.CT.
<i>G.m.morsitans</i> 11T.CT.

Fig. nº 57 - Alinhamento das sequências nucleótídicas parciais das amostras *G.m.morsitans* com a sequência de referencia EF 531200.1 (*G.morsitans*) obtida a partir do GenBank.

EF 531200.1	C CTC GAA TAA ATA ATA TAA GAT TTT GAC TTC TTC CTC CTG CTT TAT CA
<i>G.m.morsitans</i> 1T .A.T
<i>G.m.morsitans</i> 2T .A.T
<i>G.m.morsitans</i> 3T .A.T
<i>G.m.morsitans</i> 4T .A.T
<i>G.m.morsitans</i> 5T .A.T
<i>G.m.morsitans</i> 6T .A.T
<i>G.m.morsitans</i> 7T .A.T

Fig. nº 57 – Cont– Alinhamento das sequências nucleótídicas parciais das amostras *G .m. morsitans* com a sequência de referencia EF 531200.1 (*G. morsitans*) obtida a partir do GenBank.

EF 531200.1	G	GAA	TTT	CTT	TTG	ATC	GAA	TAC	CTT	TAT	TTG	TTT	GAT	CTG	TAG	TGA	TT
<i>G.m.morsitans</i> 1C.
<i>G.m.morsitans</i> 2C.
<i>G.m.morsitans</i> 3C.
<i>G.m.morsitans</i> 4C.
<i>G.m.morsitans</i> 5C.
<i>G.m.morsitans</i> 6C.
<i>G.m.morsitans</i> 7C.
<i>G.m.morsitans</i> 8C.
<i>G.m.morsitans</i> 9C.
<i>G.m.morsitans</i> 10C.
<i>G.m.morsitans</i> 11C.
EF 531200.1	A	CAG	CTT	TAT	TAT	TC	TTT	TAT	CTT	TAC	CTG	TAT	TAG	CCG	GAG	CAA	TTA

Fig. nº 57 – Cont– Alinhamento das sequências nucleótídicas parciais das amostras *G. m. morsitans* com a sequência de referencia EF 531200.1 (*G. morsitans*) obtida a partir do GenBank.

As sequências analisadas apresentaram 4 haplotipos (Hap1, Hap2, Hap3 e Hap4). Verificou-se que os haplotipos Hap1, Hap3 e Hap4 foram identificados apenas numa amostra, ou seja, o **Hap1** foi identificado na amostra consenso (EF 531200.1), o **Hap3** na amostra *G.m.morsitans* 4 e o **Hap4** na amostra *G.m.morsitans* 5.

O **Hap2** foi identificado nas restantes amostras de *G.m.morsitans*.

O cálculo da diversidade nucleótídica (π) para o total das amostras, incluindo a amostra consenso, foi de $\pi = 0,0084 \pm 0,0063$.

A diversidade haplotípica (**Hd**) foi de $0,454 \pm 0,170$ e o número de nucleótidos diferentes (**K**) foi de 4,818.

IV- CONCLUSÕES:

Como referido nos nossos objectivos para este trabalho, formou-se uma “Colónia Experimental” a partir da colónia de *Glossinas morsitans morstans* Westwood, 1850 (Diptera Glossinidae) da UEM/IHMT.

Obtiveram-se três gerações nesta colónia que foram estudadas para os seguintes objectivos:

- Contribuir para uma primeira abordagem para a caracterização molecular da *Glossina morsitans morsitans* Westwood 1850 (Díptera, Glossinidae),
- Estudar o *sex ratio* das glossinas macho e fêmea eclodidas à nascença.

Durante a formação da colónia e ao longo de cada geração, foi possível observar a relação macho/fêmea das glossinas eclodidas à nascença, podendo esta relação ser definida como sendo o número de machos para cem fêmeas.

Para determinar essa relação foram contadas todas as glossinas eclodidas à nascença e que por definição corresponde ao *sex ratio* secundário (Pavlík, 1990).

Na natureza, Fisher, 1930., e Fraga de Azevedo, 1964, afirmaram que a relação de *sex ratio* entre machos e fêmeas é de **1/1**.

A relação *sex ratio* entre glossinas macho e fêmea eclodidas na colónia em estudo por geração foi a seguinte:

Na 1ª geração a relação *sex ratio* é de **1:1,3**.

Na 2ª geração a relação *sex ratio* é de **1:1,1**.

Na 3ª geração a relação *sex ratio* é de **1:1,2**.

Pode-se, perante os resultados verificados, afirmar que a colónia de *Glossina morsitans morsitans* do IHMT apresenta um *sex ratio* idêntico ao estudado em glossinas que vivem no seu habitat natural.

O Qui-quadrado aplicado às três gerações demonstra que as diferenças de proporções entre elas, não são significativas (Qui-quadrado=0,271, Graus de liberdade=2, $p=0,873$).

Pode-se, por isso, utilizar a proporção total de 54% de glossinas fêmea (Erro Padrão da estimativa=2,8%).

O intervalo de confiança de 95% para essa proporção é de 54,0% +/- 1,96 x 2,8 (Limite inferior = 48,5%, Limite superior = 59,5%).

Como o intervalo inclui os 50% (valor descrito noutros estudos), não há diferença estatisticamente significativa, relativamente aos nossos dados (54%).

O presente trabalho permitiu também apresentar as primeiras sequências, ainda que parciais, do gene COI do ADN mitocondrial de uma população de *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 mantida há várias gerações, no insectário da UEM do IHMT.

Neste estudo foram detectados três haplotipos entre as sequências das amostras de laboratório, e quatro haplotipos quando foram comparadas as sequências com a sequência encontrada na base de dados.

Considerando que a diversidade haplotípica é um índice que reflecte a probabilidade de dois haplotipos, escolhidos ao acaso numa população, serem diferentes, enquanto que a diversidade nucleotídica reflecte a probabilidade de dois nucleótidos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes numa população (Nei & Li, 1979).

Assim, a média da diversidade haplotípica encontrada para o gene COI foi de $0,006 \pm 0,003$, e de $0,0084 \pm 0,0063$, respectivamente, apresentando uma baixíssima diversidade.

Wohlford *et al* (1999) ao compararem duas populações de *G. morsitans morsitans* criadas em laboratório, verificaram que uma das populações apresentava uma diversidade mais elevada, relativamente à outra população.

A justificação apresentada pelos autores estaria relacionada com o tempo de manutenção das populações em laboratório, ou seja, quanto maior for a manutenção das populações em laboratório, menor seria a diversidade entre elas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AFONSO, M. O., 2000. *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 (Díptera, Glossinidae) e *Trypanosoma brucei brucei* Plimmer & Bradford, 1899 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Utilização de um modelo experimental para estudo das inter relações vector-parasita. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Unidade de Entomologia Tese de Doutoramento.
- ALLSOPP, R., 1972. The role of game animals in the maintenance of endemic and enzootic trypanosomiasis in the Lambwe Valley, South Nyanza District, Kenya. *Bulletin of the World Health Organisation*, **47**: 735-746.
- ANDRADE E SILVA, M. A., 1936. *A Tsétsé em Moçambique, a nossa acção contra a mosca e doenças que ela transmite* Missão de Combate às Tripanossomíases.
- AKSOY, S., 2003. Control of tsetse flies and trypanosomes using molecular genetics. *Veterinary Parasitology*, **115**: 125-145.
- AKSOY, S., GIBSON, W. C. & LEHANE, M. J., 2003. Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Advances in Parasitology*, **53**: 1-83.
- AKSOY, SERAP., BERRIMAN, MATT., HALL, NEIL., HATTORI, M., HIDE, WINSTON. & LEHANE, MAICHAEL., 2005. A case for *Glossina* genome project. *Trends in Parasitology*, **21**.
- ASHCROFT, M. T., 1959. The importance of African wild animals as reservoirs of trypanosomiasis. *East African Medical Journal*, **36**: 289-297.
- AZEVEDO, J. F., PINHÃO, R. C., 1964. The maintenance of laboratory colony of *Glossina morsitans*. *Bull.Org. Mond. Santé*, **31**: 835-841.

- BAKER, M. D. & KRAFUR, E. S., 2001. Identification and properties of microsatellite markers in tsetse flies *Glossina morsitans morsitans* sensu lato (Diptera: Glossinidae). *Mol Ecol Notes*, **1** (4): 234-236. [PubMed: 11137738].
- BEARD, C. B., DURVASSULA, R. V., & RICHARDS, F.F., 1998. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerg Infect. Dis*, **4**: 581-91. [PubMed: 9866734].
- BERGHE, L. & LAMBRECHT, F. L., 1963. The Epidemiology and Control of Human Trypanosomiasis in *Glossina morsitans* fly-belts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **12** (2), 129-164.
- BERRIMAN, MATTHEW., GHEDIN, ELODIE., HERTZ-FOWLER, CHRISTIANE., BLANDIN, GAELLE & RENAULD, HUBERT., 2005. The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*: **Vol. 309**. no. 5733, pp. 416 – 422; DOI: 10.1126/science.1112642.
- BISOFFI, ZENO., BELTRAME, ANNA., MONTEIRO, GERALDO., ARZESE, ALEXANDRA., MAROCCO, STEFANIA., RORATO, G., ANSELMi, M. & VIALE, PIERLUIGI., 2005. *African Trypanosomiasis Gambiense, Italy, CDC.*, **11**, nº-11.
- BLANCHETOT, A. & GOODING, R. H., 1993. Genetic analysis by DNA fingerprinting in tsetse fly genomes. *Insect Biochem Mol Biol.*, **23** (8):937-44.
- BLANCHETOT, A. & GOODING, R. H., 1993. Genetic variability and segregation analysis I *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae) using DNA fingerprinting. *Genome*, **37**: 289-295.
- BOSSCHE, P VAN DEN. & STAAK, C., 1997. The importance of cattle as a food source for *Glossina morsitans morsitans* in Katete district, Eastern Province, Zambia. *Acta Tropica*, **65**: 105-109.

- BROCK, TIM CLUTTON., & LANGLEY, PETER., 1997. Persistent courtship reduces male and female longevity in captive tsetse flies *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera Glossinidae). *Int. Society for Behavioral Ecology*, **8** (4): 392-395.
- BRUCE, D., 1895. Preliminary report on the tsetse fly disease or Nagana in Zuzuland. Benett and Davis, Durban, 29 pp.
- BRUCE, D., 1896. Further report in the tsetse fly disease or nagani in Zululand. Harrision and Sons, London.
- BUXTON, P., 1955. *The Natural History of Tsetse Flies: An Account of the Biology of the Genus Glossina* (Diptera). London UK: H. K. Lewis & Co.
- CAPPELLO, M., BERGUM, P. W., VLASUK, G. P., FURMIDGE, B. A., PRITCHARD, D. L. & AKSOY, S., 1996. Isolation and characterization of the tsetse trombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*". *Am J. Trop. Med. Hyg.*, **54**, (5); 475-80.
- CHADENGA, V., 1994. Epidemiology and control of tripanosomosis. Onderstepoort *Journal of Veterinary Reserch*, **61**: 385-390.
- CHALLIER, A. & LAVEISSIERE, C., 1973. Un nouveau piege la capteur des glossines (Glossina: Diptera Muscidae). Description et essays sur le terrain. *Cahiers ORSTOM. Serie Entomologie Medicale et Parasitologie*. **11**, 251-262.
- CHEN, X., LI, S., & AKSOY, S., 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insects species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J. Mol Evol*, **48**: 49-58. [PubMed: 9873076].
- CIPRANDI, ALESSANDRA., HORN, FABIANA., & TERMIGNONI, CARLOS, 2003. *Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes*. *Rev..Bras. Hematologia e Hemostase*, **25** (4): 250-262.

- CIPRANDI, A., HORN, F. & TERMIGNONI, C., 2003. Saliva de animais hematofagos: fonte de novos anticoagulantes. *Rev. Br. Hematol. Hemoter.*, **25** (4): 250-262.
- COURTIN, D., BERTHIER, D., THEVENON, S., DAYO, C. K., GARCIA, A. & BUCHETON, B., 2008. Host Genetics in African Trypanosomiasis. *Infect. Genetic. Evol.*, **8** (3): 229-238.
- COX, F., 2004. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infect. Dis. Clin. N Am.*, 18: 231-145.
- CROSS, NICHOLAS C. P., DOVER. & GABRIEL A., 1986. Tsetse fly rDNA: an analysis of structure and sequence. *Department of Genetics, University of Cambridge-UK*, 15: nº 1.
- DALE, C. & MAUDLIN, I., 2001. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host parasite interactions. *Intenational Journal of Parasitology*, **111**: 187-191.
- DALE, COLIN., YONG, SIMON., HAYDON, DANIEL., & WELBURN, SUSAN., 2001. The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *PNAS*, 98 (4): 1883-1888.
- DARBY, A. C., J. LAGNEL., MATTHEW, C. Z., BOURTZIS, K., MAUDLIN, I. & WELBURN, S. C., 2005. Extrachromosomal DNA of the Symbiont *Soldalis glossinidius*. *Journal of Bacteriology*, **187** (14): 5003-5007.
- DE KRUIT, P., 1926. MICROBE HUNTERS. New York: HARCOURT, BRACE. & HIDE, G., 1999. History of sleeping in East Africa. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12** (1): 112-125.

- DIAS, J. A., TRAVASSOS SANTOS, 1987. Contribuição para o estudo da sistemática do género *Glossina* Wiedemann, 1830 (Insecta, Brachycera, Cyclorrhapha, Glossinidae). Proposta para a criação de um novo subgénero . *Garcia Orta Ser Zool Lisboa*, **14**: 67-78.
- DONELSON, JOHN., 2003. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Tropica*, **85**: 391-404.
- FAO Food and Agriculture Organisation of the United Nations., 1992. *Corporate Document Repository; Tsetse biology, systematics and distribution. Agriculture and Consumer Protection*.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit-1 from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3** (5): 294-299.
- FORD, J., 1963. The Distribution of the Vectors of African Pathogenic Trypanosomes. *Bull. Org. mond. Santé*, **28**: 653-669.
- FORD, J. & LEGATTE, B. M, 1961. The geographical and climatic distribution of trypanosome infections rates in *Glossina morsitans* group of tsetse flies (*Glossina* Weid, Diptera). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**: 383-397.
- FRAGA DE AZEVEDO., 1967. Geografia Médica da Doença do Sono. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **9** (4): 239-294.
- FRANÇA, C., 1905. Sobre as glossinas da África Oriental existentes no Museu de Lisboa. *Jornal de Sciencias Mathematicas Physicas e Naturais*, **7** (2ª série): 137-140.

- GEIGER, ANNE., CUNY, G., & FRUTOS R., 2005. Two Tsetse Fly Species, *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina morsitans morsitans*, Carry Genetically Distinct Populations of the Secondary Symbiont *Sodalis glossinidius*. American Society for Microbiology, **71** (12): 8941-8943.
- GEIGY, R. & KAUFFMAN, M., 1973. Sleeping sickness survey in the Serengeti área (Tanzania), 1971. I. Examination of large mammals for trypanosomes. *Acta Trópica*, **30**: 12-23.
- GIDUDU, A. M., CUISANCE, D., REIFENBERG, J. M. & FRESIL, J. L., 1995
Contribution à l'étude de la transmission de *Trypanosoma congolense* par *Glossina morsitans morsitans* (Díptera, Glossinidae) au laboratoire. *Revue. Elev. Méd. Vet. Pays trop*, **48** (3): 264-270.
- GOODING, R. H., 1990. Genetic aspects of quality control in tsetse colonies. *Insect Sci*, **11**: 385-98.
- GOODING, R. H., 1984. Tsetse genetics: a review. *Quaest. Entomol.*, **20**: 89-128.
- GOODING, R. H. & KRAFSUR, E. S., 2005. Tsetse Genetics: Contributions to Biology, Systematic and Control of Tsetse Flies. *National Institute of Health Annu Rev Entomol.*, **50**: 101-123.
- GREEN, C. H., 1986. Effects of colours and synthetic odours on the attraction of *Glossina pallidipes* and *Glossina morsitans* to traps and screens. *Physiological Entomology*, **11**, 411-421.
- GREEN, C. H., 1994. Baits methods for tsetse fly control. *Advances in Parasitology*, **34**, 229-291.

HARGROVE, J. W., 1999. Reproductive abnormalities in field tsetse flies in Zimbabwe. *Entomologia experimentalis et Applicata*, **92**, 89-99.

HARGROVE, J. W., 2000. A theoretical study of the invasion of cleared areas by tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, **90**: 201-209.

HARGROVE, J. W., 2003. Tsetse population dynamics. *Unpublished paper*, pp 48.

HARGROVE, J. W., HOLLOWAY, M. T. P. & VALE, G. A., 1995. Catches of tsetse (*Glossina* spp.) (Diptera: Glossinidae) from traps and targets baited with large doses of natural and synthetic host odour. *Bull. End. Res.*, **85**: 215-227.

HARGROVE, J. W., & VALE, G. A., 1980. Catches of *Glossina morsitans morsitans* Westwood and *G. pallipides* Austen (Diptera: Glossinidae) in odour-baited traps in riverine and deciduous woodlands in the Zambezi Valley of Zimbabwe. *Bulletin of Entomological Research*, **70**: 571-578.

HOARE, C. A., 1970. The mammalian trypanosomes of Africa. In: Mulligan, H. W. (ed) *The African trypanosomiasis*. George Allen and Unwin, London, pp 3-23.

HORNEY, H. E., 1948. *Preliminary report on tsetse-fly conditions near Mutuáli*. Missão de Combate às Tripanossomíases Colónia de Moçambique

JACK, R. W., 1939. *Studies in the physiology and behaviour of Glossina morsitans Westw.*, Salisbury (Southern Rhodesia, Memoirs of the Department of Agriculture **1**).

JORDAN, A. M., 1974. Recent developments in the ecology and methods of control of tsetse flies (*Glossina* spp) (Diptera: Glossinidae)- a review. *Bulletin of Entomological Research*, **63**: 361-399.

- K. GULL., 1999. The Cytoskeleton of Trypanosomatid Parasites. *Annual Review of Microbiology*, **53**: 629-655.
- KATE, D., 2002. *Wigglesworthia glossinidia*, no mundo dos genomas sequenciados *Genome News Network*
- KRAFSUR, E. S., & WOHLFORD, D. L., 1999. Breeding structure of *Glossina pallidipes* populations evaluated by mitochondrial variation. *Journal of Heredity*, **90**: 635-645. [PubMed: 10589514].
- KRAFSUR, E. S., MADSEN, M., WOHLFORD, L., MIHOK, S. & GRIFFITHS., T. 2000. Population genetics of *Glossina morsitans submorsitans* (Diptera: Glossinidae). *Bull Entomol. Rev.* **90** (4): 329-335.
- KRAFSUR, E. S., ENDSLEY, M. A., WOHLFORD, D. L., GRIFFITHS, N. T. & ALLSOPP, R., 2001. Genetic differentiation of *Glossina morsitans centralis* populations. *Department of Entomology – Insect Mol Biol*, **10** (4): 387-395.
- KUMAR, S., TAMURA, K., & NEI, N., 2004. MEGA3: Integrate software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment Briefings in *Bioinformatics*, **5**: 150-163.
- LAMBRECHT, F. L., 1980. Ecological and physiological factors in the cyclic transmission of African Trypanosomiasis. *Insect Science and its Application*, **1**: 47-51.
- LANGLEY, P. A. & PIMPLEY, R. W., 1975. Quantitative aspects of reproduction and larval nutrition in *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera, Glossinidae) fed in vitro. *Bull. Ent. Res.* **65**: 129-142.

- LEHANE, M. J., AKSOY, S., GIBSON, W., KERHORNOU, A., BERRIMAN, M., HAMILTON, J., SOARES, M. B., BONALDO, M.F., LEHANE, S. & HALL, N., 2003. Adult midgut expressed sequence tags from the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* and expression analysis of putative immune response genes. *Genome Biology*, **4**: R63.
- LONG, SHAOJUN., JIRKU, MILAN., AYALA, FRANCISCO. & LUKES, JULIUS., 2008. Mitochondrial localization of Human frataxin is necessary but processing is not for rescuing frataxin deficiency in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105, **36**: 13468-73.
- MACFADDIN, JEAN F., 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. *Williams & Wilkins*. p 441.
- MACHADO, A. B., 1954. *Nouvelles contributions à l'étude systématique et biogéographique des Glossines (Diptera)*. Lisboa, Publicações culturais da Companhia de Diamantes de Angola.
- MACHADO, A. BARROS., 1970. *Les races géographiques de Glossina morsitans*. Junta de Investigação do Ultramar, pp: 471-486.
- MOLYNEUX, D. H., 1977. Vector relationships in the Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*, **15**: 1-82.
- MOLYNEUX, D. H. & STILES, J. K., 1991. Trypanosomatid-vector interactions. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **71**: 151-166.
- MOLOO, S. K., STEIGER, R. F., BRUN, R. & BOREHAM, P. F., 1971. Sleeping sickness survey in Musoma district, Tanzania. II. The role of *Glossina* in the transmission of sleeping sickness. *Acta Tropica*, **28**: 189-205.

- NDEGWA, PAUL. & MIHÓK, STEVE., 2001. Les préférences d'habitat et les rythmes d'activité de *Glossina swynnertoni* Auten (Díptera: Glossinidae), Aitong, Masai Mara, Quénia. *Insect Sci. Aplic.*, **21** (2): 113-122.
- OMS., 2005. *Controlo da Tripanossomiase Humana: Estratégia para a Região Africana*. AFR/RC: **55/11**.
- OKINWELU, S. N., 1978. Host preference and trypanosome infection rates of *Glossina morsitans morsitans* Westwood in the Trpublic of Zambia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **71**: 101-107.
- PAISANA, F. C., 1958. Reconhecimentos glossínicos efectuados no Distrito da Zambésia. *Estudos Vet. De Moçambique*, **109**: 157 pp.
- PATRICK, P. ABILA., *et all*, 2008. High Levels of Genetic Differentiation between Ugandan *Glossina fuscipes fuscipes* Populations by Lake Kyoga. *PLoS Negl Tropical Diseases*, **2** (5): e242.
- PATTERSON, J. S. & SCHOLFIELD, C. J., 2005. Preliminary study of wing morphometry in relation to tsetse population genetics. *South African Journal of Science* **101**.
- PETERSEN, FREDERIK TORP., MEIER, RUBOLF., KUTTY, SUJATHA. & WIEGMANN, B., 2007. The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. *Molecular Phylogenetics Evolution*, **45**: 111-122.
- PIET BORST. & RUDENKO, G., 1994. Antigenetic Variation in African Trypanosoma. *Science Jorn.* **V.264**.
- PINHÃO, R. C., 1966. Contribuição para o estudo da reprodução e ciclo evolutivo de *Glossina morsitans*. *Anais do IHMT*, **23** (3-4): 311-450.

- PIRES, F. A., 1948. Missão de Combate às Tripanossomíases – Colónia de Moçambique. *Relatório de Serviço referente ao 2º e 3º trimestre*.
- WOHLFORD, D. L., KRAFSUR, E. S., GRIFFITHS, N. T., MARQUEZ, J.G. & BAKER, M. D., 1999. Genetic Differentiation of some *Glossina morsitans morsitans* populations. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 377-385.
- R.H. GOODING & E.S. KRAFSUR., 2005. Tsetse Genetics: Contributions to Biology, Systematics, and Control of Tsetse Flies. *Annu Rev. Entomology*, **50**: 101-123.
- REBELO, A.1938. *A Doença do Sono no Distrito de Tete*. Serviços de Saúde- Colónia de Moçambique.
- ROCHA, L. C., 1994^a A introdução da doença do sono em Moçambique no princípio do século. Parte I. O contexto ambiental em Moçambique e o aparecimento da doença do sono nas “Rodésias” e na “Niassalândia”. *Revista Médica de Moçambique*, **5** (2): 3-7.
- ROCHA, L. C., 1994b A introdução da doença do sono em Moçambique no princípio do século. Parte II. Os movimentos da população em Moçambique e a ameaça de invasão pela doença do sono. *Revista Médica de Moçambique*, **5** (3): 3-8.
- ROCHA, L. C., 1994c A introdução da doença do sono em Moçambique no princípio do século. Parte III. “O Serviço de defesa contra a doença do sono”. *Revista Médica de Moçambique*, **5** (4): 3-7.
- ROCHA, F. R. & PIRES, F. A., 1966. Vinte anos de luta contra a doença do sono 1946-1955. *O Médico*, **792**: 377-402.
- ROGERS, DAVID. & RANDOLPH, SARAH., 2003. Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS. *Nature Reviews Microbiology* **1**, 231-237

- ROGERS, DAVID. & RANDOLPH, SARAH., 2003. Results of statistical modelling of the distribution of vectors and disease using selected temporal fourier-processed images as predictor variables .*Nature Reviews Microbiology* **1**, 231-237.
- ROGERS, D. J., 1974. Natural regulation and movement of tsetse fly populations. In: Les Moyens de Lutte contre les *Trypanosomes* et leur Vecteurs, pp. 35-38. Paris: Institut Elevage Medicale Veteriniraire Pays Tropicale.pp:387.
- ROGERS, D. J.,1988. A General Model for the the African trypanosomiasis. *Parasitology*, **97**: 193-212.
- ROGERS, D. J. & RANDOLPH, S. E., 1985 Population ecology of tsetse. *Annual Review of Entomology*, **30**: 197-216.
- ROZAS, J., SANCEZ-DelBARRIO, J. C., MESSEGUER, X. & ROZAS, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphismanalyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19** (1): 2496-2497.
- SANTOS DIAS, J. A. T., 1956. *Descrição de uma nova subespécie de tsetse de Moçambique; Glossina austeni mossurizensis n. ssp.*, Moçambique (Reprinted from Moçambique, **88**: 51.
- SHERENI, W., 1984. The use of cloth screens and acetone vapour as alternatives to a bait ox for sampling populations of tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Transactions of the Zimbabwe Scientific Association*, **62**, 22-27.
- SPATH, J., 1995. Olfactory attractants for West African tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Trop. Med. Parasitol.* **46**: 253-257.
- STEVERDING, DIETMAR., 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasite Vactors*, **1**: 3.

- STOTHARD, J. R., HUGHES, S. & ROLLINSON, D., 1996. Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snails hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta Tropica*, **61** (1): 19-29.
- TORR, S. J. & HARGROVE, J. W., 1999. Behaviour of tsetse (Diptera: Glossinidae) during the hot season in Zimbabwe: the interaction of micro-climate and reproductive status. *Bulletin of Entomological Research*, **89**, 365- 379.
- TORR, S. J. & MANGWIRO, T.N.C. 2000. Interactions between cattle and biting flies: effects on the feeding rate of tsetse. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**: 400-409.
- VALE, G.A. & HARGROVE, J. W., 1979. A method for studying the efficiency of traps for tsetse flies (Diptera: Glossinidae) and other insects. *Bulletin of Entomological Research*, **69**: 183-193.
- VALE, G. A., 1999. Responses of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) to vegetation in Zimbabwe: implications for population distribution and bait siting. *Bulletin of Entomological Research*, **88**, Supplement 1, S 7-S 59.

ANEXOS:

Anexo 1

Glossinas de 1ª Geração (Maio a Junho de 2008)

Frascos	Nº de pupas em cada frasco	Glossinas fêmea eclodidas	Glossinas macho eclodidas	Pupas não eclodidas
1	8	4	2	2
2	9	4	5	0
3	9	5	3	1
4	10	5	3	2
5	10	6	4	0
6	9	5	4	0
7	9	5	4	0
8	8	5	3	0
9	9	4	5	0
10	8	4	4	0
11	9	5	4	1
12	10	4	3	2
13	9	4	4	1
14	9	3	5	1
15	8	6	2	0
	Total de pupas 134	Total = 69	Total = 55	Total = 10

Anexo 2

Glossinas de 2ª Geração (Junho de 2008)

Frascos	Nº de pupas em cada frasco	Glossinas fêmea eclodidas	Glossinas macho eclodidas	Pupas não eclodidas
1	10	3	5	2
2	9	3	5	1
3	9	4	3	2
4	8	4	4	0
5	9	5	4	0
6	7	4	2	1
7	8	4	4	0
8	8	4	3	1
9	7	3	3	1
10	10	6	4	0
	Total= 85	Total =40	Total =37	Total =8

Anexo 3

Glossinas de 3ª Geração (Julho a Agosto de 2008)

Frascos	Nº de pupas em cada frasco	Glossinas fêmeas eclodidas	Glossinas machos eclodidas	Pupas não eclodidas
1	10	4	6	0
2	9	4	4	1
3	9	4	3	2
4	8	4	4	0
5	9	5	3	1
6	7	4	2	1
7	8	4	4	0
8	8	5	3	0
9	7	4	3	0
10	10	6	2	2
11	9	4	4	1
12	10	4	6	0
13	9	5	4	0
14	8	3	5	0
15	6	3	2	1
16	5	3	2	0
	Total de pupas = 132	Total = 66	Total = 57	Total = 9